



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO**  
**FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS**  
**CARRERA DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA**



---

**Posible papel estrogénico de metales pesados en cultivos de células de  
cáncer de mama MCF-7.**

---

Trabajo de Titulación, modalidad Proyecto de Investigación, previo a la obtención del Título de Ingeniero Bioquímico, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos.

**Autor:** David Alejandro Cabrera Riofrío  
**Tutora:** Dra. Marisel De Lucca Osorio, PhD.

Ambato – Ecuador  
Julio 2017

## APROBACIÓN DEL TUTOR

Dra. Marisel De Lucca Osorio, PhD.

### **CERTIFICA:**

Que el presente trabajo de titulación ha sido revisado. Por lo tanto, autorizo la presentación de este Trabajo de Titulación modalidad Proyecto de Investigación, el mismo que responde a las normas establecidas en el Reglamento de Títulos y Grados de la Facultad.

Ambato, 17 de Mayo de 2017



---

Dra. Marisel De Lucca Osorio, PhD.

C.I 175781830-5

**TUTORA**

## DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, David Alejandro Cabrera Riofrío, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Proyecto de Investigación, previo a la obtención del título de Ingeniero Bioquímico son absolutamente originales, auténticos y personales: a excepción de las citas bibliográficas.



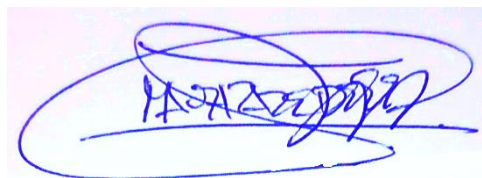
---

Sr. David Alejandro Cabrera Riofrío  
C.I. 180437717-2  
**AUTOR**

## **APROBACIÓN DE LOS MIEMBROS DE TRIBUNAL DE GRADO**

Los suscritos profesores Calificadores, aprueban el presente Trabajo de Titulación modalidad Proyecto de Investigación, el mismo que ha sido elaborado de conformidad con las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos de la Universidad Técnica de Ambato.

Para constancia firman:



Presidente del Tribunal



Lic. Mg. Yunys Pérez Betancourt  
C.I.175647174-0



Ing. Mg. Cristian Fernando Galarza Galarza  
C.I.180316027-2

Ambato, 22 de Junio de 2017

## DERECHOS DE AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de este Proyecto de Investigación o parte de él, un documento disponible para su consulta y procesos de investigación, según las normas de la institución.

Cedo los Derechos en línea patrimoniales de mi Proyecto, con fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de este proyecto dentro de las regularizaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autor.



---

Sr. David Alejandro Cabrera Riofrío  
C.I. 180437717-2  
**AUTOR**

## **AGRADECIMIENTOS**

Hoy celebro el fin de una etapa especial en mi vida, me despido de grandes amigos y maestros, a quienes agradezco su acompañamiento durante todos estos años, que me permitieron estar aquí, culminando un anhelo en mi vida.

A mis padres quienes permanentemente me apoyaron con espíritu alentador, contribuyendo incondicionalmente a lograr mis metas y objetivos propuestos. ¡Les amo!

A la Doctora Soledad Sánchez, por su apoyo, amistad y confianza durante el desarrollo de esta investigación, a su buena voluntad, empeño, dedicación y tiempo, que me ayudaron adquirir grandes conocimientos y destrezas útiles para mi formación como profesional.

Agradezco al departamento de Fisiología y Farmacología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Cantabria, por ceder las células MCF-7 utilizadas en el desarrollo experimental de esta tesis, sin las cuales no se hubiese podido llevar a cabo.

A la Doctora Marisel De Lucca, por ayudarme en el diseño de primers, manejo de RT-qPCR e interpretación de resultados para culminar con éxito el presente trabajo.

Al Doctor Wilber Romero Fernández, por su enseñanza, paciencia, amistad y su buen humor, a todos los miembros que conforman el grupo de investigación y desarrollo e innovación biomédica “GIDIB”, de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Técnica de Ambato.

A la Doctora Yenddy Carrero, a su manera de ser, motivando a los estudiantes, hacer excelentes investigadores e impartiendo su conocimiento ante cualquier duda o ayuda requerida en el presente trabajo.

A mis compañeros Cristian Carvajal, Israel Manjarres y Andrés Tayo, por su apoyo, colaboración y experiencia que fueron de gran ayuda, para efectuar técnicas de laboratorio utilizadas en este proyecto.

Un agradecimiento especial a mí querida Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos, a sus autoridades, investigadores y docentes.

## ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

### PÁGINAS PRELIMINARES

Portada.....	I
Aprobación del tutor.....	II
Declaración de Autenticidad.....	III
Aprobación de los miembros de tribunal de grado.....	IV
Derechos de Autor.....	V
Agradecimientos.....	VI

### INDICE

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	9
<b>CAPÍTULO I</b> .....	12
<b>EL PROBLEMA</b> .....	12
1.1. Tema de la investigación.....	12
1.2. Justificación.....	12
1.3. Objetivos.....	13
1.3.1. Objetivo General.....	13
1.3.2. Objetivos Específicos.....	13
<b>CAPÍTULO II</b> .....	14
<b>MARCO TEÓRICO</b> .....	14
2.1 Antecedentes Investigativos.....	14
2.2 Hipótesis.....	18
2.2.1 Los metales pesados actúan como agentes estrogénicos, aumentando la proliferación en las células de cáncer de mama MCF-7 bajo las condiciones experimentales propuestas en este trabajo.....	18

Variable independiente .....	18
Variable dependiente .....	18
2.2.2 Los metales pesados producen un aumento en la expresión del RE- $\alpha$ en las células de cáncer de mama MCF-7, bajo las condiciones experimentales propuestas en este trabajo. ....	19
Variable independiente .....	19
Variable dependiente .....	19
2.2.3 Existe competencia entre los metales pesados y el estradiol por su unión al RE. ....	19
Señalamiento de variables de la hipótesis.....	19
Variable independiente .....	19
Variable dependiente.....	19
<b>CAPÍTULO III.....</b>	<b>20</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>20</b>
3.1 Materiales .....	20
3.2 Métodos.....	21
3.2.1 Descongelación y crecimiento de células MCF-7 .....	21
3.2.2 Mantenimiento de la línea celular MCF-7 .....	21
3.2.3 Preparación de FBS sin hormonas (estripeado).....	22
3.2.4 Cultivo celular en microplacas de 96 pocillos .....	22
3.2.5 Adición de metales pesados.....	23
3.2.6 Determinación cuantitativa de la proliferación celular (MTT) .....	24
3.2.7 Extracción de ARN de células MCF-7 .....	24
3.2.8 Determinación de la cantidad y pureza del ARN, .....	26
3.2.9 Tratamiento del ARN con la enzima DNase I. ....	26
3.2.10 Selección de los cebadores para RT-qPCR .....	27
3.2.11 Normalización del gen de referencia <i>GADPH</i> mediante la determinación del Ct.....	27



3.2.12	Determinación de la expresión genética del RE- $\alpha$ mediante RT-qPCR	28
3.2.13	Reacción de RT-qPCR .....	29
3.2.14	Análisis de la expresión del gen del RE- $\alpha$ .....	29
3.2.15	Electroforesis en gel de agarosa .....	29
3.2.16	Electroforesis SDS/PAGE.....	30
3.2.17	Western blot .....	30
3.3	Diseño Experimental.....	33
<b>CAPÍTULO IV</b>	.....	<b>34</b>
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	.....	<b>34</b>
4.1	Análisis y discusión de los resultados.....	34
4.1.1	Ensayos con diferentes concentraciones de metales pesados y número de células por pocillo. ....	34
4.1.2	Elección de concentraciones óptimas de metales pesados .....	38
4.1.3	Evaluación del efecto estrogénico de metales pesados a través del receptor de estrógenos.....	40
4.1.4	Microscopia de fluorescencia: Competencia entre el estradiol (FITC) y metales pesados por su unión al RE- $\alpha$ .....	41
4.1.5	Expresión del RE- $\alpha$ por Western Blot.....	46
4.1.6	Cuantificación de la expresión del gen del RE- $\alpha$ mediante Transcripción Reversa y PCR en Tiempo Real (RT-qPCR) .....	47
4.1.6.1	Cuantificación de ARN total, tras cultivar las células MCF-7 con las diferentes concentraciones óptimas de metales pesados.....	47
4.1.7	Validación del uso del gen de referencia <i>GADPH</i> mediante la determinación del Ct.....	48
4.1.8	“Cuantificación relativa de la expresión del gen RE- $\alpha$ utilizando el método $\Delta\Delta Ct$ ” .....	51
4.2	Verificación de hipótesis .....	57

Los Metales pesados producen un aumento en la expresión del receptor de estrógenos en las células de cáncer de mama MCF-7, bajo las condiciones experimentales propuestas en este trabajo. ....	58
Existe competencia entre los metales pesados y el estradiol por su unión al <i>RE-<math>\alpha</math></i> . ....	59
<b>CAPÍTULO V</b> .....	60
<b>CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</b> .....	60
5.1 Conclusiones .....	60
5.2 Recomendaciones .....	61
<b>MATERIALES DE REFERENCIA</b> .....	62
Referencias Bibliográficas .....	62

## INDICE DE TABLAS

Tabla I. Primers diseñados por MACROGEN.....	27
Tabla II. Concentración y pureza del ARN obtenido antes y después del tratamiento con DNAasa I.....	48
Tabla III. Ct obtenidos a partir de las diferentes diluciones del ARN extraído de las células tratadas con los metales.....	49
Tabla IV. Ct por triplicado y medias obtenidos mediante RT-qPCR a partir del gen de referencia <i>GAPDH</i> con los diferentes tratamientos .....	54
Tabla V. Ct por triplicado y medias obtenidos mediante RT-qPCR a partir gen diana <i>RE-<math>\alpha</math></i> con los diferentes tratamientos.....	54
Tabla VI. Niveles de expresión relativa obtenidos según el método $\Delta\Delta Ct$ .....	54
Tabla VII. Análisis estadístico Chi-cuadrado ( $X^2$ ) GraphPad Pris.....	57

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismo de acción del estrógeno en el desarrollo de cáncer de mama sobreactivación de genes c-fos y c-myc.....	17
Figura 2. Adición de tratamientos metales pesados placa de 96 pocillos.....	23
Figura 3. Temperaturas de reacción utilizadas para la amplificación del RE...	28
Figura 4. Proliferación celular después de la Incubación con estradiol.....	34
Figura 5. Proliferación celular después de la Incubación con cadmio.....	35
Figura 6. Proliferación celular después de la Incubación con cromo.....	35
Figura 7. Proliferación celular después de la Incubación con plomo.....	36
Figura 8. Proliferación celular después de la Incubación con níquel.....	36
Figura 9. Proliferación celular después de la Incubación con mercurio.....	37
Figura10. Proliferación celular después de la Incubación con arsénico.....	37
Figura 11. Proliferación celular después de la Incubación con ICI fulvestran....	38
Figura 12. Efecto de las diferentes concentraciones de metales pesados sobre la proliferación celular luego de 48 horas de incubación.....	39
Figura 13. Efecto de las diferentes concentraciones de metales pesados + ICI fulvestrant sobre la proliferación celular luego de 48 horas de incubación.....	40
Figura 14. Células cultivadas con estradiol con fluorescencia (FITC).....	42
Figura 15. Células cultivadas con estradiol (FITC) + Cadmio.....	42
Figura 16. Células cultivadas con estradiol (FITC) + Cromo.....	43
Figura 17. Células cultivadas con estradiol (FITC) + Plomo.....	43
Figura 18. Células cultivadas con estradiol (FITC) + Mercurio.....	44
Figura 19. Células cultivadas con estradiol (FITC) + Níquel.....	44
Figura 20. Células cultivadas con estradiol (FITC) + Arsénico.....	45
Figura 21. Células cultivadas con estradiol (FITC) + ICI fulvestrant.....	45

Figura 22. Electroforesis SDS/PAGE.....	46
Figura 23. Western Blot, usando un anticuerpo ERalpha.....	47
Figura 24. Western Blot, usando un anticuerpo $\alpha$ Tubulin,....	47
Figura 25. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de 2 $\mu$ g de ARN tratado con la enzima DNAasa I.....	48
Figura 26. Gráfica de normalización del Ct obtenido de la amplificación del gen de referencia <i>GAPDH</i> ,.....	49
Figura 27. Curvas de <i>melting</i> .....	50
Figura 28. Normalización del gen.....	51
Figura 29. Amplificación del gen de referencia <i>GAPDH</i> y <i>RE<math>\alpha</math></i> en células de cáncer de mama MCF-7.....	52
Figura 30. Curvas de <i>melting</i> .....	52
Figura 31. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5%.....	53
Figura 32. Expresión relativa normalizada $\Delta\Delta$ Ct.....	55
Figura 33. Clustergram de la expresión relativa.....	56

## RESUMEN

Los estrógenos pueden actuar como un importante factor de riesgo en el desarrollo del cáncer de mama, un incremento en los estrógenos producidos en nuestro organismo, o una sobreexposición a estrógenos ambientales como los metales pesados hacen que se desencadene una cascada de señales que lleva a la sobreactivación de genes oncogénicos (c-fos, c-myc) a través de los receptores de estrógenos (RE). Este mecanismo promueve el desarrollo de un fenotipo maligno, mediante la alteración del ciclo celular conduciendo a la formación de tumores. El objetivo principal del presente proyecto fue evaluar el papel estrogénico de los metales pesados en cultivos de células de cáncer de mama MCF-7, para establecer un modelo experimental que nos permita estudiar las alteraciones que se producen a nivel celular al exponer estas células a diferentes concentraciones de metales. El efecto de distintas concentraciones de metales pesados (cromo, plomo, mercurio, níquel, cadmio y arsénico) en células MCF-7, fue analizado mediante su acción sobre la proliferación celular y la expresión génica del receptor de estrógenos alfa (RE- $\alpha$ ). Además, se examinó la unión de estos metales a este receptor, mediante estudios de competencia en presencia de estradiol-FITC, a través de técnicas de microscopia de fluorescencia. Los resultados obtenidos indican que estos metales pesados tienen un efecto estrogénico sobre las células MCF-7, y que este efecto lo ejercen a través de su unión al RE- $\alpha$ .

**Palabras Clave:** Cáncer de mama, receptor de estrógeno, metales pesados, MCF-7, genes oncogénicos.

## ABSTRACT

Estrogens could act as an important risk factor in the development of breast cancer, an increase in estrogen produced in our body, or an overexposure to environmental estrogens such as heavy metals cause a signal cascade that leads to the overactivation of oncogenic genes (c-fos, c-myc) through estrogen receptors (ERs). This mechanism promotes the development of malignant phenotype, by altering the cell cycle leading to the formation of tumors. The main objective of the present project was to evaluate the estrogenic role of heavy metals in cultures of MCF-7 breast cancer cells to establish an experimental model that allows us to study the alterations that occur at the cellular level when exposing these cells to different metal concentrations. The effect of different concentrations of heavy metals (chromium, lead, mercury, nickel, cadmium and arsenic) on MCF-7 cells was analyzed by its action on cell proliferation and estrogen receptor gene expression alpha (RE- $\alpha$ ). In addition, the binding of these metals to this receptor was examined by competition studies in the presence of estradiol-FITC, through fluorescence microscopy techniques. The results indicate that these heavy metals have an estrogenic effect on MCF-7 cells, and this effect exerts it through their binding to RE- $\alpha$

**Keywords:** Breast cancer, estrogen receptor, heavy metals, MCF-7, oncogenic genes.

## INTRODUCCIÓN

En nuestro país durante los últimos años se ha producido un incremento significativo en el número de personas diagnosticadas con algún tipo de cáncer (intestino, pulmón, piel, mama, etc.). Entre estos, dentro de la población femenina, el que mayor número de muertes causa es el cáncer de mama, en nuestra provincia se reportaron 73 casos en el 2015. (Muñoz, et al., 2014).

El cáncer de mama es un tumor maligno que se desarrolla a partir de células mamarias sanas. Generalmente, este cáncer se origina en las células de los lobulillos (glándulas productoras de leche), o en los conductos, (vías que transportan la leche desde los lobulillos hasta el pezón), con menos frecuencia, puede originarse en los tejidos estromales que incluyen a los tejidos conjuntivos grasos y fibrosos de la mama, (Breastcancer.org, 2017)

Uno de los mecanismos por los que puede llegar a producirse este tipo de tumor es por un exceso de estrógenos en el organismo, debido a que el estrógeno producido en las mujeres estimula el crecimiento de las células mamarias. La exposición a esta hormona durante periodos prolongados ininterrumpidos puede aumentar el riesgo de producirse cáncer de mama. (Wohl, 2014). El estrógeno va a ejercer su función uniéndose al RE, provocando un desarrollo y proliferación descontrolada de las células que llevarán a la formación del tumor. Entre los RE los más estudiados, asociados al cáncer de mama son los RE- $\alpha$  y RE- $\beta$ , su importancia radica en que permiten que muchas sustancias actúen como mitógenos, al sobreactivar la transcripción de genes oncogénicos como: c-fos-, c-myc (Nilsson, et al 2001).

Dada la importancia de los estrógenos en el cáncer mamario, muchas terapias están dirigidas contra sus receptores, inhibiendo los efectos estrogénicos sobre las células neoplásicas de cáncer de mama.

En pacientes con cáncer de mama avanzado, la presencia del RE en las células del tumor constituyen la variable más importante para la predicción de la respuesta a la terapia endocrina; alrededor del 75% de los pacientes con tumores expresan el RE (RE+) por lo que responden a dicha terapia, mientras que el 25% restante no lo expresan (RE-) por lo que no responden bien a esta terapia, o debido a que la producción de estos receptores por las células tumorales no estén relacionados con el crecimiento del tumor (Cammarata-scalisi et al., 2008).

No solo existen estrógenos endógenos, sino que también existen estrógenos exógenos o xenoestrógenos, entre los cuales se encuentran los metales pesados. La exposición en humanos a alguno de estos estrógenos ambientales, produce problemas a nivel del sistema nervioso central, desórdenes endocrinos, problemas reproductivos como infertilidad, alteraciones en el ciclo menstrual, preclamsia, parto prematuro, e incluso abortos (Tsutsumi et al, 2005; Crain et al, 2008).

La contaminación por metales pesados puede producirse de manera natural principalmente por la actividad volcánica, presencia de metales en rocas o suelos (Valderas, et al 2013), o también puede producirse por actividades llevadas a cabo por el hombre como: la explotación de minas, actividad agrícola, el uso descontrolado de pesticidas y fungicidas, actividades de curtidurías, textileras y lubricadoras entre otras, que probablemente explican las elevadas concentraciones de metales pesados en los ríos. Esto genera impactos sobre la calidad del agua, la biodiversidad acuática, contaminación de los alimentos y sobre la salud pública (Kibria et al., 2016).



Las vías a través de las cuales los metales pueden entrar al organismo son: inhalación, contacto con la piel, ingesta de alimentos y de agua contaminada. Muchos de los tóxicos ambientales pueden acumularse en el cuerpo, en especial en el de las mujeres por su mayor contenido en células grasas y provocan diferentes enfermedades, entre ellas cáncer de mama (Valls-Llobet, 2010).

Teniendo en cuenta todo lo expuesto podríamos inferir que existe una relación entre la contaminación por metales pesados y la alta incidencia de cáncer de mama. Por ello en este trabajo se planteó estudiar el efecto estrogénico de estos metales.

# CAPÍTULO I

## EL PROBLEMA

### 1.1. Tema de la investigación

Posible papel estrogénico de metales pesados en cultivos de células de cáncer de mama MCF-7

### 1.2. Justificación

Los datos que hasta ahora se tienen sobre el cáncer de mama indican que la incidencia de este tipo de tumor varía de unos países a otros, afectando más a los países con mayor nivel de desarrollo económico, apareciendo la tasa más alta en Estados Unidos, Canadá y Australia, con una incidencia de 90 por cada 100 mil mujeres, en comparación con América del Sur y Europa con 48 por cada 100 mil mujeres diagnosticadas, y menos de 20 por cada 100 mil en Asia del este (Lappano, et al.,2016).

En Ecuador, según un reporte de la Organización Panamericana de la Salud (OPS), el cáncer de mama es la primera causa de muerte dentro de la población femenina, con una tasa de mortalidad del 35,4%, seguido por el cáncer de piel con un 32%. Las cifras más altas aparecen en Quito, (Muñoz,et al.,2014), donde el 8% de las mujeres de entre 25 y 64 años, fallecen por esta causa.

A pesar de los notables adelantos en la detección temprana, el diagnóstico y el tratamiento del cáncer de mama, los ministerios de salud afrontan retos de diversos órdenes para crear y apoyar programas de atención de salud que puedan mejorar el desenlace en este tipo de cáncer (Anderson et al., 2007).

Este estudio se planteó teniendo en cuenta la alta incidencia de cáncer de mama que existe en Ecuador y la contaminación por metales pesados que hay en el agua de sus ríos y canales de riego, por lo que nos propusimos confirmar el carácter estrogénico de estos contaminantes, estableciendo un modelo experimental en células de cáncer de mama MCF-7.

### **1.3. Objetivos**

#### **1.3.1. Objetivo General**

Evaluar el posible papel estrogénico de metales pesados en cultivos de células de cáncer de mama MCF-7.

#### **1.3.2. Objetivos Específicos**

1. Determinar las condiciones óptimas, a las que diferentes concentraciones de metales pesados, número de células y tiempo de incubación, inciden en la proliferación de las células cancerígenas MCF-7
2. Evaluar el efecto de la concentración elegida para cada uno de los metales pesados e inhibidor del receptor de estrógenos sobre la proliferación celular de células de cáncer de mama MCF-7.
3. Verificar si se produce un aumento en la expresión del receptor de estrógenos alfa (RE- $\alpha$ ) en las células cancerígenas MCF-7, tras cultivarlas con las diferentes concentraciones de metales pesados.
4. Identificar si existe competencia entre el estradiol y los metales pesados por su unión al RE- $\alpha$  en las células cancerígenas MCF-7.

## **CAPÍTULO II**

### **MARCO TEÓRICO**

#### **2.1 Antecedentes Investigativos**

Los metales pesados son un grupo de elementos químicos de elevado peso molecular, en general tóxicos para los seres vivos, que se pueden encontrar en el agua, aire y suelo. Normalmente estos metales pueden estar en forma soluble o combinados con otros elementos formando compuestos orgánicos e inorgánicos. Aunque los organismos vivos requieren pequeñas cantidades de algunos metales pesados para llevar a cabo sus funciones vitales como el hierro, cobalto, cobre, manganeso, molibdeno, y zinc. Sin embargo, otros metales en cantidades excesivas resultan tóxicos para el organismo y son considerados como cancerígenos por la IARC, estos metales actuarían alterando el funcionamiento normal de enzimas, proteínas, y hormonas, entre otras funciones metabólicas (Cañizares V., 2000).

Los metales pesados entran en el cuerpo a través del aire, la comida, el agua o el contacto con la piel, una vez dentro, estos tienen que atravesar la membrana plasmática de la célula para ejercer su efecto. Si un metal está en forma lipófila, como el metil mercurio y compuestos de arsénico, este penetra fácilmente al interior celular mediante endocitosis, uniéndose a proteínas, tal como cadmio-metalotioneína. Las enzimas a menudo requieren iones metálicos para funcionar, y muchas de ellas muestran una "preferencia" por el zinc, así este metal permite una actividad enzimática óptima, sin embargo, cuando el zinc está acompañado de concentraciones altas de cadmio o plomo, estos lo sustituirán, impidiendo que el zinc realice su función. El cadmio en particular, tiene una estructura atómica muy similar a la del zinc, se adapta muy bien a los

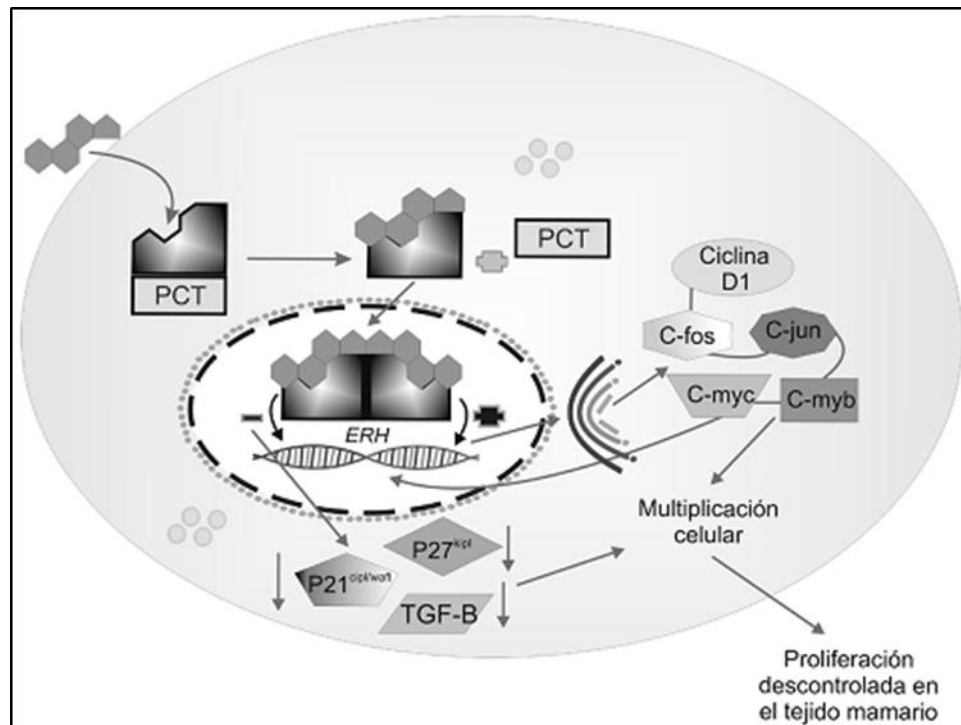
sitios de unión del zinc de enzimas críticas, como la ARN transferasa. Estas enzimas ayudan prácticamente en todas las funciones celulares; catalizan las diversas reacciones químicas dentro de las células, como la producción de energía y desintoxicación. Los metales tóxicos reemplazan los minerales nutritivos en sitios de unión a enzimas, produciendo la inhibición enzimática por la interacción entre el metal y un grupo sulfidrilo (SH) de la enzima. La exposición a metales tóxicos puede disminuir la actividad de miles de enzimas, debido a que no se forma bien el complejo enzima-sustrato, lo que llevaría a un mal funcionamiento de estas, incluso su inactividad, provocando, de esta manera problemas en los procesos fisiológicos que se llevan a cabo en nuestro organismo generando diferentes problemas para la salud (Philip H. Kass, 2014).

Además de la importancia de las enzimas como reguladores de las funciones metabólicas en las células, existen otros factores importantes en el desarrollo de cáncer mamario, como es el caso de los estrógenos, que son una familia de hormonas esteroideas sintetizados en una variedad de tejidos, pero que se producen principalmente en los ovarios durante los años reproductivos. Una de las principales funciones de los estrógenos es promover el crecimiento y diferenciación de los órganos sexuales y de otros tejidos de reproducción. La interrupción del sistema reproductivo de los animales machos y hembras en la naturaleza se ha atribuido a exposición a contaminantes ambientales que imitan los efectos del estradiol. Sugiriéndose que la alta incidencia de cánceres y enfermedades relacionadas con hormonas también se debe a la presencia de estrógenos. (Martin et al., 2003).

Además de los mencionados factores, en el desarrollo del cáncer mamario están involucrados diferentes mecanismos, como mutaciones en las células somáticas, alteraciones en el ambiente hormonal materno, variantes heredadas relacionadas con la expresión de receptores hormonales de estrógenos,

progesterona, HER-2 y leptina. (Hilakivi, 2006). Las rutas propuestas que modifican los efectos del ambiente hormonal fetal o incrementan la susceptibilidad de cáncer mamario en el adulto, han generado la hipótesis de que la exposición fetal a estradiol E2, leptina o un inductor de obesidad dietético (OID), modifican las características heredables de la glándula mamaria por inducción de cambios epigenéticos. Estos cambios son manifestados en el adulto por expresión alterada de RE y MAPK, y por la alteración de la morfología de glándula mamaria, la cual induce cambios en las unidades terminales ductales lobulares. Existen diversos compuestos que mediante su anclaje con receptores específicos que se encuentran en las células blanco, actúan como factores de crecimiento o mitógenos en las células cancerosas, como citocinas, hormonas, proteínas, y neurotransmisores, entre otros, (Knaul et al, 2009; Del Socorro et al, 2010). Al unirse a los receptores activan diferentes vías de señalización intracelular, activando a su vez la transcripción de diversos genes que regulan el metabolismo, el ciclo celular, la apoptosis y la diferenciación entre otras funciones (Alberts, 2002).

Entre los RE, los RE- $\alpha$  y RE- $\beta$  son los más estudiados en el cáncer de mama, su importancia radica en la sobreactivación de la transcripción de genes oncogénicos (c-fos, c-myc) por los estrógenos en mujeres, que a través de estos receptores promueven el desarrollo de un fenotipo maligno en las células, al producir un descontrol del ciclo celular y apoptosis. En este sentido, se sabe que niveles elevados de estrógenos en el organismo, actúan como un factor de riesgo importante en el desarrollo de cáncer de mama (Nilsson et al, 2001).



**Figura 1.** Mecanismo de acción del estrógeno en el desarrollo de cáncer de mama. Sobreactivación de genes c-fos y c-myc. Fuente: (Nilsson et al, 2001).

Dada la importancia de los estrógenos y sus receptores en la carcinogénesis mamaria, muchas investigaciones en la actualidad están dirigidas al desarrollo de terapias contra estos receptores, mejorando el pronóstico a pacientes con cáncer de mama RE+, mediante la inhibición de los efectos de los estrógenos en células neoplásicas de cáncer de mama, sin alterar los efectos benéficos sobre los huesos, el sistema cardiovascular y nervioso tienen estos estrógenos (Cammarata-Scalisi et al, 2008). La sobreexpresión del RE- $\alpha$  en las células MCF-7 puede ser evaluada mediante técnicas avanzadas como, RT-qPCR que combina la detección y cuantificación en un mismo paso, al correlacionar el producto de la RT-qPCR de cada uno de los ciclos con una señal de intensidad de fluorescencia (Leb et al., 2004).

Trabajos recientes en la cuantificación de la expresión genética del RE en células MCF-7, utilizan genes de mantenimiento expresados en las células MCF-7 como genes de referencia o controles endógenos, ya que están expuestos a las mismas condiciones, proporcionando una indicación directa de la cantidad y calidad de las muestras utilizadas en los estudios. Entre estos genes están:  $\beta$ -actina (ACTB), gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa (GAPDH) y  $\beta$ -2-microglobulina (B2M). Sin embargo, recientemente se ha detectado que la expresión de algunos de estos genes puede verse afectada durante procesos celulares como la diferenciación y la progresión del cáncer de mama (Lyng, Lænkholm, Pallisgaard, & Ditzel, 2008).

## **2.2 Hipótesis**

### **2.2.1 Los metales pesados actúan como agentes estrogénicos, aumentando la proliferación en las células de cáncer de mama MCF-7 bajo las condiciones experimentales propuestas en este trabajo.**

#### **Hipótesis Nula**

Los metales pesados no son agentes estrogénicos y por lo tanto, no aumentan la proliferación celular bajo nuestras condiciones experimentales

#### **Hipótesis Alternativa**

Los metales pesados son agentes estrogénicos y por lo tanto, aumentan la proliferación celular bajo nuestras condiciones experimentales

Señalamiento de variables de la hipótesis

#### **Variable independiente**

Metales pesados

#### **Variable dependiente**

Proliferación celular



**2.2.2 Los metales pesados producen un aumento en la expresión del RE- $\alpha$  en las células de cáncer de mama MCF-7, bajo las condiciones experimentales propuestas en este trabajo.**

**Hipótesis Nula**

Los metales pesados no aumentan la expresión del RE- $\alpha$  en las células, bajo nuestras condiciones experimentales.

**Hipótesis Alternativa**

Los metales pesados aumentan la expresión del receptor de estrógenos en las células, bajo nuestras condiciones experimentales.

Señalamiento de variables de la hipótesis

**Variable independiente**

Metales pesados

**Variable dependiente**

Expresión del RE- $\alpha$

**2.2.3 Existe competencia entre los metales pesados y el estradiol por su unión al RE.**

**Hipótesis Nula**

Los metales pesados no compiten con el estradiol por su unión al RE.

**Hipótesis Alternativa**

Los metales pesados compiten con el estradiol por su unión al RE.

**Señalamiento de variables de la hipótesis**

**Variable independiente**

Metales pesados

**Variable dependiente**

Unión al receptor de estrógeno

## CAPÍTULO III

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Materiales

Se emplearon células de carcinoma mamario MCF-7 que expresan el RE $\alpha$ , cedidas por el departamento de Fisiología y Farmacología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Cantabria, así como diferentes medios para el crecimiento de las células, DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*), MEM (*Modified Eagle's Medium*), adicionalmente Suero Fetal Bovino (FBS), Penicilina y estreptomina (P/S), Buffer fosfato salino (PBS), y tripsina-EDTA 0,25% y Dimetilsulfóxido (DMSO) al 10%. Para la extracción del ARN se utilizó el kit PureLink® RNA Mini Kit (Thermo Fisher Scientific) y para la cuantificación de la expresión del RE- $\alpha$  el Kit de PCR tiempo real SuperScript® III Platinum® SYBR® Green One-Step qRT-PCR Kit (Thermo Fisher Scientific), Primers descritos por (Bao, Wang & Mo, 2016) para el RE- $\alpha$  y gen de referencia GAPDH, diseñado por el Doctor Wilber Romero.

La cantidad de proteína se cuantificó utilizando el reactivo de Bradford. SDS (Dodecilsulfato sódico), TEMED (Tetrametiletilendiamina) y PSA (Persulfato de amonio), se utilizaron para la preparación del gel SDS-PAGE y el Western blot. La técnica de microscopia de fluorescencia nos permitió visualizar la competencia entre el estradiol marcado con fluorescencia y los diferentes metales pesados.

## **3.2 Métodos**

### **3.2.1 Descongelación y crecimiento de células MCF-7**

Las células MCF-7 almacenadas en medio DMEM enriquecido con FBS al 10% y DMSO al 10% en una atmósfera de nitrógeno líquido  $-196^{\circ}\text{C}$ , se descongelaron, para ello el vial que contenía las células se colocó en baño maría a  $37^{\circ}\text{C}$  por menos de 1 min, a continuación la suspensión se transfirió a un tubo falcón que contenía 5 ml de DMEM suplementado con 10% de FBS, y 1% de P/S, que neutralizarán el efecto del DMSO donde se congelaron. Posteriormente se centrifugó a 1500 rpm por 5 min, eliminando el sobrenadante. El pellet se resuspendió en 15 ml de DMEM suplementado con 10% de FBS y 1% de P/S, y se pasó a un flack, el cual se incubó a  $37^{\circ}\text{C}$ , con 5% de  $\text{CO}_2$  y humedad relativa (condiciones utilizadas durante todas las incubaciones celulares) donde las células crecieron adheridas al fondo de la frasca.

### **3.2.2 Mantenimiento de la línea celular MCF-7**

Cuando las células crecieron hasta un 80% de confluencia el medio se retiró y las frascas fueron lavadas con 10 ml de PBS 1X a  $37^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente se añadieron 5 ml de una solución de tripsina/EDTA al 0,25% a  $37^{\circ}\text{C}$  para despegar las células de la superficie de las frascas y se realizó una incubación de 5 min a  $37^{\circ}\text{C}$ , a continuación, la actividad de la tripsina se inhibió con la adición de 10 ml de medio DMEM suplementado como se ha descrito anteriormente.

La suspensión celular se centrifugó a 1500 rpm por 5 min y el pellet se resuspendió en 3 ml de medio DMEM suplementado, para ser repartido en tres flacks de cultivo celular de 75 cc, colocando 1 ml en cada uno y completando con 14 ml de medio DMEM suplementado. Estos flacks se incubaron, hasta que las células volvieron a estar a 80% de confluencia, repitiéndose este proceso

tantas veces como fue necesario. Estas células fueron utilizadas para los diferentes experimentos.

### **3.2.3 Preparación de FBS sin hormonas (estripeado)**

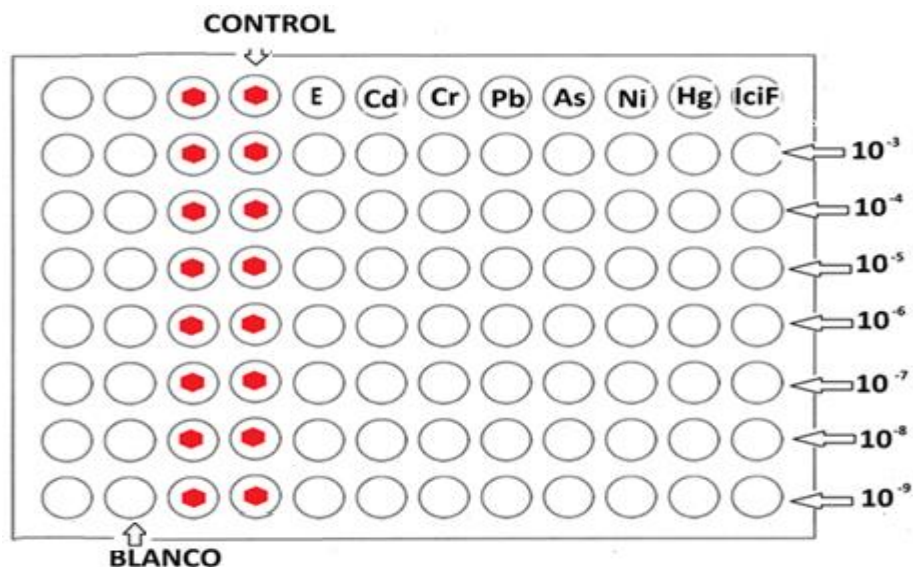
La eliminación de las hormonas estrogénicas del suero se realizó, según la metodología descrita por García Vidal & Gonzáles Cabeza (2015). El FBS se incubó con 1% (p/v) de carbón activado (Sigma-Aldrich) y 0.1% (p/v) de dextrano T-70 (Sigma-Aldrich), a 56°C en baño maría durante 30 min con agitación, seguido de centrifugación durante 15 min a 4000 x g, a 4°C. El sobrenadante fue recogido y posteriormente se trató de nuevo en las mismas concentraciones de carbón y dextrano, seguido de incubación en baño maría a 37°C durante 30 min y posterior centrifugación durante 60 min a 6500 x g. El sobrenadante fue nuevamente recogido, filtrado y esterilizado a través de un filtro de 0.22 µm (Millipore).

### **3.2.4 Cultivo celular en microplacas de 96 pocillos**

Las células MCF-7 se sembraron en placas de 96 pocillos, en DMEM sin rojo fenol, suplementado con 2 mM de L-Glutamina, 1% P/S, y 5% de FBS (estripeado). De la suspensión celular obtenida de cada frasca de cultivo, se tomaron 100 µL y se mezclaron con 100 µL de Trypan Blue (Sigma-Aldrich), lo cual permitió valorar la proporción de células vivas (las que no se tiñen), frente a las muertas (teñidas de azul). Para llevar a cabo el recuento celular se utilizó una cámara de Neubauer (Marienfeld, 2010) y un microscopio óptico bajo un aumento de 40X. Una vez hecho el recuento, se tomó el volumen correspondiente que contenía 6000 células, las cuales se sembraron en una placa de 96 pocillos en 200 µL de DMEM con suero estripeado sin rojo fenol, y se incubaron durante 24 horas. Transcurrido ese tiempo se adicionaron los diferentes tratamientos de metales pesados a cada pocillo.

### 3.2.5 Adición de metales pesados

Los diseños experimentales se realizaron teniendo en cuenta el factor de proliferación celular (crecimiento) vs concentración de metales. Partiendo de concentraciones stock de  $10^{-2}$  M hasta  $10^{-9}$  M, de los metales pesados (cadmio, cromo, plomo, arsénico, níquel, mercurio), asimismo se utilizó el estradiol que actúa como un modulador selectivo de los receptores estrogénicos, siendo nuestro control positivo en todos los ensayos. ICI fulvestrant (medicamento utilizado en el tratamiento de cáncer de mama) que inactiva el receptor de estrógenos impidiendo que se unan los metales pesados y el estradiol, este como control negativo, evaluando de esta manera el efecto estrogénico al impedir que los metales pesados ejerzan su efecto incidiendo en la proliferación celular. En cada pocillo se adicionaron 200  $\mu$ L, de medio DMEM con suero estripeado sin rojo fenol con un metal diferente en la concentración elegida, estradiol e ICI fulvestrant. Se realizaron 8 réplicas de cada experimento, se incluyó un blanco que no contiene células, solo medio y un control con células sin ningún tipo de tratamiento.



**Figura 2.** Adición de tratamientos de metales pesados en placa de 96 pocillos

### **3.2.6 Determinación cuantitativa de la proliferación celular (MTT)**

Para evaluar la proliferación celular se aplicó un método colorimétrico que consiste en la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2.5-difeniltetrasol (MTT), realizado por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa, dando como resultado un compuesto coloreado azul denominado formazán. Después de transcurridas 48 horas de incubación de las células MCF-7 con los diferentes metales, el medio se eliminó y las placas se lavaron 3 veces con 100µL de PBS 1X a cada pocillo, para eliminar restos celulares, de medio o de metales. Luego se diluyeron 5mg de MTT en 1ml de PBS y se mezcló con 10ml de medio DMEN sin rojo fenol, y suero estripeado para adicionar 110µL de la mezcla a cada pocillo, e incubar durante 4 horas permitiendo la formación de formazán. Luego de este tiempo, se adicionaron 100µL de Docedil sulfato de sodio (SDS)-HCl 0,01% a cada uno de los pocillos, para detener la reacción y disolver los cristales de formazán, una vez añadido el SDS, la placa se incubó todo la noche. Pasado este tiempo, se leyó cada placa en un espectrofotómetro lector de microplacas (PerkinElmer Víctor X3) a una longitud de onda de 570nm. Siendo la absorbancia obtenida proporcional al número de células vivas o proliferación de celular.

### **3.2.7 Extracción de ARN de células MCF-7**

Para la extracción de ARN, se utilizó el kit comercial (PureLink® RNA Mini Kit, Thermo Fisher Scientific), para ello, utilizamos 1.000.000 células resuspendidas en 1ml de PBS 1X. Previamente las células fueron sembradas en placas de 24 pocillos, con las diferentes concentraciones de metales pesados elegidas: cadmio, cromo, plomo, níquel, mercurio, arsénico, ICI fulvestrant y estradiol.

**Lisis celular:** Las células se recolectaron siguiendo el protocolo definido anteriormente y se transfirieron a un tubo falcón libre de ARNasas, posteriormente se centrifugaron a 2000xg por 5 minutos a 4°C, para sedimentar

el pellet de células, después, se descartó el sobrenadante del medio, y luego se añadió 0,6 ml de buffer de lisis combinado con 6µL de 2-mercapto-etanol, esta mezcla, se vorteo hasta que el sedimento celular se dispersó y las células quedaron lisadas.

**Homogenización:** Se centrifugó el lisado celular a 12.000xg por 2 minutos, luego se transfirió a un tubo falcón limpio para homogenizarlo usando un rotor homogeneizador (MRCLAB, Sonic-650WT), a velocidad máxima durante al menos 45 segundos, posteriormente se centrifugó el homogenizado a 26.000 x g durante 5 minutos, luego se transfirió el sobrenadante a un tubo falcón limpio libre de ARNasas.

**Purificación:** Se añadió un volumen de 0,6ml de etanol al 70%, a cada volumen del homogenizado celular, después se vorteo para mezclar y dispersar las fases visibles formadas, posteriormente se transfirieron hasta 700µL de la muestra una columna junto con un tubo de recolección para eliminar los restos y disolventes que se utilizaron en las etapas posteriores y permitir que el RNA extraído se quede pegado a la columna, luego esta columna se centrifugó a 12.000xg durante 15 minutos a temperatura ambiente y se descartó el sobrenadante que había caído al tubo de recolección, esto se realizó hasta procesar toda la muestra.

Luego se añadieron 700µL de buffer de lavado 1 a la columna anterior y se centrifugó a 12.000xg por 15 segundos a temperatura ambiente, nuevamente se descartó el sobrenadante del tubo de recolección. Posteriormente, se añadieron 500µL del buffer 2 de lavado (disuelto en etanol) a la columna, que se centrifugó a las mismas condiciones anteriores. Para secar la membrana con el ARN pegado a ella, se descartó el tubo de recolección y se insertó en la columna el tubo de recuperación para quedarnos con el ARN final, para ello se añadieron 100µL de agua libre de ARNasas al centro de la columna, se incubó

a temperatura ambiente por 1 min, posteriormente, centrifugamos la columna por 2 min. a 12.000xg para eluir el ARN de la columna, para obtener un rendimiento de ARN mayor a 100µg, se realizaron 2 eluciones secuenciales con 100µL de agua libre de ARNasas en el mismo tubo de recuperación.

### **3.2.8 Determinación de la cantidad y pureza del ARN,**

La cuantificación de las muestras de ARN obtenido se realizó mediante la lectura de su absorbancia a 260nm en un espectrofotómetro (NanoDrop 2000-UV-Vis Spectrophotometer). La pureza se midió mediante el cociente entre la absorbancia 260nm y 280nm, el cual hace referencia a la cantidad de proteínas presentes en la muestra. Un resultado de 2,0 indicó un ARN puro, sin contaminantes.

### **3.2.9 Tratamiento del ARN con la enzima DNase I.**

El tratamiento con la enzima DNAsa I (Invitrogen, California, Estados Unidos), elimina cualquier traza de ADN que pueda contaminar la muestra de ARN. Para ello, se colocó en un tubo de 200µL: El volumen equivalente a 2,5 µg de ARN; 1 µL de 10X DNase I Reaction Buffer; 1 µL de DNase I Amplification Grade y Agua DEPC hasta completar 10 µL. Las muestras se mezclaron vigorosamente en el vórtex durante 10 segundos a temperatura ambiente y se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente, para que la enzima actúe. Una vez transcurrido el tiempo, se detuvo la reacción con 1 µL de 25 mM EDTA (pH 8.0), el cual es muy importante para evitar la degradación del ARN por parte de las ARNsas activadas por cationes divalentes como Ca<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup>. Posteriormente, se inactivó la enzima DNAsa I incubando la mezcla a 65°C por 10 minutos en el termobloque (Eppendorf Thermomixer, Madrid, España). Para obtener en un volumen total de 11 µL de muestra, en el cual hay 2,5 µg de ARN purificado y sin contaminación con ADN.



### 3.2.10 Selección de los cebadores para RT-qPCR

Se utilizaron los cebadores descritos por (Bao, Wang & Mo, 2016), para el RE- $\alpha$ , y para el gen de referencia GAPDH, diseñados por el Doctor Wilbert Romero, los cuales fueron analizados utilizando la herramienta BLAST del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>) para verificar, por comparación frente a las bases de datos del GenBank, la especificidad de los primers hacia los genes de interés, se consideraron adecuadas las parejas de oligonucleótidos (primers) cuya longitud esté alrededor de 20-25 pares de bases, su porcentaje de G+C sea de aproximadamente el 50%, su Tm cercana a 60°C, su composición no favorezca a la aparición de estructuras secundarias y la longitud del fragmento que se amplifique este en torno a 150 pb – 200 pb.

**Tabla I. “Secuencia de los primers diseñados por MACROGEN.”**

Gen	Secuencia	Longitud	% GC	Longitud amplicon Pb
GAPDH-F	5'-TGCACCACCAACTGCTTAGC-3'	20	55	87
GAPDH-R	5'-GGATGGACTGTGGTCATGAG-3'	20	57.1	87
SRE1-F	5'-CCTGATGATTGGTCTCGTCTG-3'	21	52.38	185
SRE1-R	5'-GGCACACAAACTCCTCTCC-3'	19	57.89	185

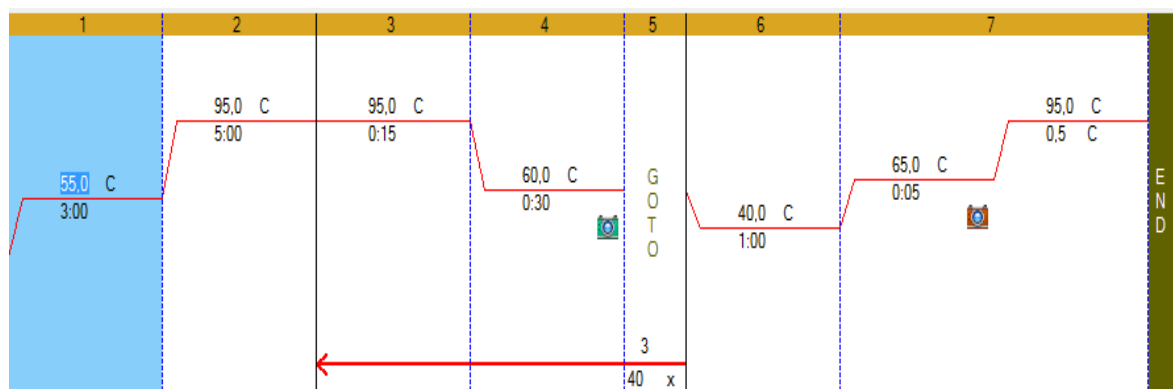
### 3.2.11 Normalización del gen de referencia *GADPH* mediante la determinación del Ct.

Para evaluar si la expresión genética del gen de referencia *GADPH* se ve afectada por la presencia de los diferentes metales pesados utilizados durante el cultivo celular, se probaron diferentes concentraciones de ARN, partiendo desde 0.10, 0.15, 0.20, 0.25 y 0.30  $\mu$ g de ARN, para una reacción de 25  $\mu$ l totales de mezcla, la condiciones de amplificación fueron las mismas que se describen en la figura 3.

### 3.2.12 Determinación de la expresión genética del RE- $\alpha$ mediante RT-qPCR

La reacción de PCR a tiempo real se llevó a cabo en un termociclador de tiempo real (CFX96 *Touch*<sup>™</sup> *Real-Time PCR Detection System*), utilizando el kit comercial de PCR tiempo real (*SuperScript*<sup>®</sup> *III Platinum*<sup>®</sup> *SYBR*<sup>®</sup> *Green One-Step qRT-PCR Kit*). Para estandarizar la técnica, se ensayaron diferentes condiciones de amplificación, y diferentes concentraciones de primers, así como del resto de reactivos y RNA. Los ciclos y fases que se utilizaron en esta PCR en tiempo real fueron: síntesis del ANDc 55°C durante 3 minutos desnaturalización inicial de 5 minutos a 95°C seguida de 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos, anillamiento a 60°C durante 30 segundos y extensión a 40°C durante 1 minuto. Una vez finalizada la qRT-PCR se procedió a cuantificar la cantidad de expresión del RE- $\alpha$  obtenida, para ello se utilizó el *software* de análisis de la expresión génica, CFX Biorad que por defecto trae el equipo.

#### Ciclos de temperatura CFX96 *Real-time system*.



**Figura 3.** Temperaturas de reacción utilizadas para la amplificación del RE- $\alpha$  Fuente: *Software* Biorad CFX96 Real time

### 3.2.13 Reacción de RT-qPCR

#### Componentes

Super Script III RT/platinum Taq mix	0.50µl
Mezcla de reacción SYBER Green 2x	12.5µl
Primers 10µM c/u en mezcla	1µl
Colorante de referencia ROX	0.50µl
ARN células MCF-7	0.25µg
Agua DEPC	hasta 25 µl totales

### 3.2.14 Análisis de la expresión del gen del RE- $\alpha$

Para el análisis de la expresión del gen RE- $\alpha$  se utilizó, el *software* del equipo que realiza una expresión normalizada  $\Delta\Delta Ct$ , que al tener una muestra control o calibrador, el programa ajusta el nivel de expresión de la muestra control a 1. De esta manera normaliza las cantidades relativas de todos los genes blanco a la cantidad del control. (Hellemans, et al., 2007).

### 3.2.15 Electroforesis en gel de agarosa

#### Preparación de la muestra

El ARN obtenido se mezcló en una relación 5:1 la solución con buffer de carga *BlueJuice* 10x (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Estados Unidos), para comprobar la calidad e integridad de las bandas. Los productos amplificados de qRT-PCR se cargaron en un volumen total de 10 µL en relación 9:1.

#### Preparación del gel

Se utilizó un gel de agarosa a una concentración del 1,5%. Para ello se pesaron 0,36 gr de agarosa ultra pura (Invitrogen), se disolvieron en 30mL de buffer TBE 1X, y por último, se añadieron 3µL de SYBR Green II (Thermo Fisher

Scientific). La mezcla se dejó gelificar en la bandeja de electroforesis con un peine por 20 a 40 minutos.

#### Corrida electroforética

El gel se colocó en la cámara de electroforesis sumergida en buffer TBE 1X. Se aplicó un voltaje de 80 V por 45 minutos.

#### **3.2.16 Electroforesis SDS/PAGE**

Se prepararon 2 geles uno concentrador al 3% y separador al 12%, una vez disuelto todos los componentes del gel, la mezcla se dejó gelificar por 25 minutos. Se colocó un peine y se completó el volumen con gel concentrador a la mitad de la cámara. Luego las muestras proteicas obtenidas de las células MCF-7, con los diferentes tratamientos se colocaron en un termoblock a 95°C por 5 minutos en tubos eppendorf de 1.5 ml, para desnaturalizar las proteínas y que estas vuelvan a su estructura primaria, a continuación se centrifugaron todos los tubos para homogenizar las fases. Se cargaron 35µl de la solución en cada pocillo del gel con una concentración de 22µg totales de proteínas de cada tratamiento para cada una de las muestras. En el orden de control, estradiol, cadmio, cromo, plomo, níquel, mercurio, arsénico e ICI fulvestrant. La corrida electroforética se realizó a 80 voltios durante 2 horas y treinta minutos.

#### **3.2.17 Western blot**

Una vez corrida la electroforesis SDS/PAGE, se colocó el gel en 10 ml de buffer de transferencia por 15 minutos juntamente con las esponjas y la membrana de nitrocelulosa, para generar una transferencia proteica a la membrana dependiendo de la carga iónica de las proteínas. Para extraer las proteínas del núcleo se realizó una ruptura de la membrana celular de las células MCF-7 por ultra sonido, en el homogeneizador (MRCLAB, Sonic-650WT), a velocidad máxima durante al menos 45 segundos, posteriormente se centrifugó el

homogenizado a 26.000 x g durante 60 minutos, para quedarnos con el sobrenadante donde se encuentran las proteínas de interés y se resuspendieron en 1ml de buffer de recogida TBS 1X con 1mM de EDTA.

#### **Transferencia en el Trans-Blot SD Transfer cell:**

La transferencia de proteínas del cultivo de células con los diferentes tratamientos se realizó empleando el sistema Trans-Blot® SD, Semy-Dry transfer Cell (Bio-Rad, California, Estados Unidos) a 100 mA, durante 60 min, utilizando el buffer de transferencia TRIS-HCl 25 mM pH 8,3, glicina 192 mM y 20% etanol.

#### **Adición de anticuerpos:**

Una vez realizada la transferencia el gel se cortó, junto con la membrana de nitrocelulosa y se colocó BSA al 4% con un volumen de 4ml para bloquear las uniones inespecíficas del anticuerpo por 1 hora con agitación orbital, posteriormente se retiró el BSA al 4% y se adicionó el anticuerpo del RE- $\alpha$  monoclonal sc-514857 RE- $\alpha$  (C-3) (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) a una concentración de 1:250, marcado con Alexa 488, para así verificar un aumento en la expresión del RE- $\alpha$ , luego de esto se realizaron tres lavados con PBS 1X para colocar el anticuerpo monoclonal  $\alpha$ -Tubulin (B-7): sc-5286 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.), con una concentración 1:500 marcado con Texas red Cy5.5, para comprobar si las muestras fueron cargadas en la misma cantidad y concentración.

#### **3.2.18 Ensayos de competencia mediante microscopia de fluorescencia**

Para evaluar si los metales pesados compiten con el estradiol por su unión al RE- $\alpha$  se llevó a cabo la técnica de microscopia de fluorescencia, para ello se utilizaron placas de 6 pocillos, donde se colocó un cubre objetos estéril en cada

pocillo, posteriormente se añadieron 200µl de células MCF-7 y 1mL de medio DMEM (estripeado), las placas se incubaron durante 24 horas, pasado este tiempo, se adicionó el estradiol marcado con fluorescencia en una dilución (1:500µl), seguidamente se añadieron los metales pesados en las diferentes concentraciones y también ICI fulvestrant con el fin de bloquear el RE- $\alpha$ , impidiendo que se unan los metales pesados o el estradiol.

### **Permeabilización de la membrana de células MCF-7**

Luego de incubadas las placas, se realizaron 3 lavados con PBS 1X, y se adicionó 1 mL. de paraformaldehído (PFA 4%), por 20 minutos, pasado este tiempo, se lavaron los pocillos nuevamente con PBS 1X tres veces y se colocó 1mL de Glicina (20mM en PBS1X PH=7.4) durante 20 minutos, nuevamente realizamos tres lavados con PBS 1X, y después se colocó 1 mL. de tritón 100X (Buffer 1X PBS 20mM Glicina 0.5% Triton 100X) por 5 minutos, actuando como un agente tensoactivo que permite romper la membrana celular. Se bloquearon las células, evitando que se destruya la matriz extracelular y se sequen utilizando, BSA (albúmina de suero bovino) al 2% por una hora, con el fin de evitar las interacciones inespecíficas.

Finalmente se realizó un último lavado con PBS 1X, tres veces y se adicionó estradiol marcado con fluorescencia (1:500µL) a diferentes tiempos: 5, 10, 15, 20, 30, 40 minutos. Se realizaron varios ensayos para estandarizar el mejor tiempo de incubación y concentración de estradiol marcado con FITC (fluoresceína-5-isotiocianato).

Una vez estandarizado el método en cada placa se añadieron las diferentes concentraciones de metales pesados y se incubó a 37°C por 15 minutos, por otra parte se adicionaron metales pesados junto con ICI fulvestrant, para evaluar si su efecto lo ejercen a través de su unión al RE- $\alpha$  al ser este

bloqueado. Finalmente se usó medio de montaje con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol). (Sigma-Aldrich, San Luis, Misuri, Estados Unidos), este es un marcador fluorescente que se une fuertemente a regiones con grandes cantidades de Adenina y Timina en secuencias de ADN, tiñendo al núcleo celular de color azul.

### **3.3 Diseño Experimental**

Todos los experimentos planteados en este proyecto de trabajo de titulación se realizaron por triplicado, los resultados obtenidos en los diferentes ensayos, se procesaron y analizaron, utilizando el programa GraphPad Prisma 6.0 (GraphPad Software). Realizando análisis paramétricos, aplicados a variables ajustadas a una distribución normal de varianza de una sola vía (ANOVA), en caso de valores significativos del mismo; test de Tukey-Kramer, para calcular las diferencias estadísticamente significativas existentes entre los distintos grupos experimentales. Los resultados se consideraran estadísticamente significativos para valores de  $P < 0.05$ , además de un diseño de un solo factor.

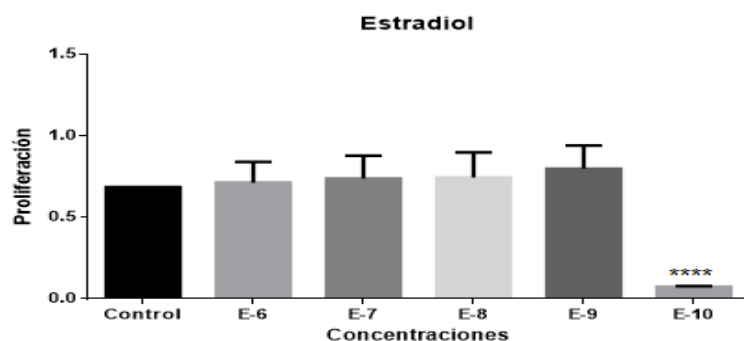
## CAPÍTULO IV

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 4.1 Análisis y discusión de los resultados

##### 4.1.1 Ensayos con diferentes concentraciones de metales pesados y número de células por pocillo.

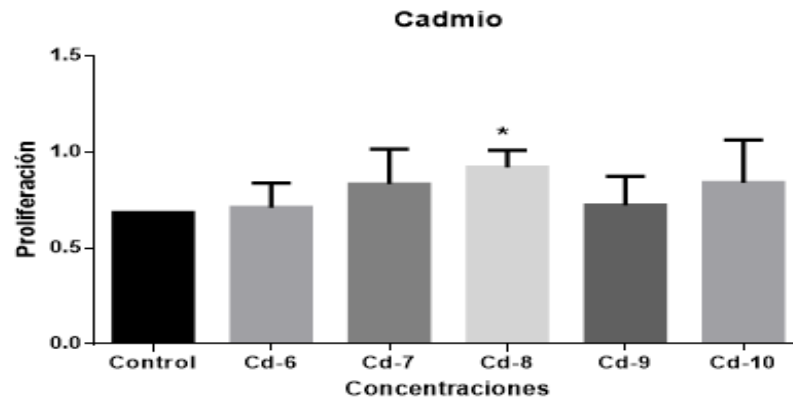
Se probaron diferentes concentraciones de metales pesados partiendo de una solución *stock* de  $10^{-2}$  M a partir de la cual, preparamos las concentraciones a ensayar desde  $10^{-6}$  M hasta  $10^{-10}$  M. Asimismo, se determinó la concentración de células adecuada para realizar los experimentos probando con diferentes concentraciones desde 6.000 hasta 10.000 células por pocillo. Las placas sembradas con 10.000 células/pocillo, presentaron confluencia y saturación, lo cual ocasionó que se despegaran al momento de realizar los lavados con PBS 1X, antes de adicionar los metales pesados, obteniendo una medida de absorbancia por debajo del control, por dicho motivo se eligió como concentración óptima para realizar todos experimentos 6000 células/pocillo.



**Figura 4.** Proliferación celular después de la incubación con estradiol. \*\*\*\* $p < 0.001$  respecto al control. E-6 – E-10: concentraciones ensayadas de estradiol desde  $10^{-6}$  hasta  $10^{-10}$

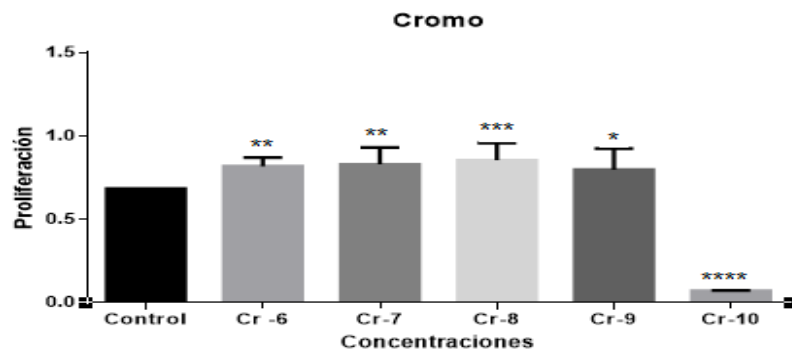


Al realizar la incubación con estradiol (control positivo) se puede observar (fig. 4) que la proliferación celular es mayor al utilizar la concentración de  $10^{-9}$  M, por lo que se eligió esa concentración como óptima.



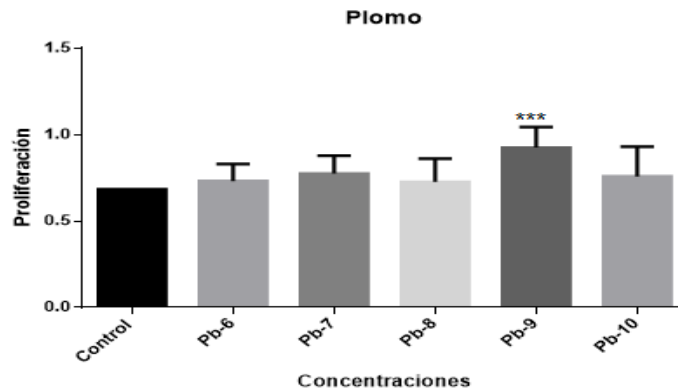
**Figura 5.** Proliferación celular después de la incubación con cadmio.\*  $p < 0.05$  respecto al control. Cd-6 – Cd-10: concentraciones ensayadas de cadmio desde  $10^{-6}$  hasta  $10^{-10}$

Luego del tiempo de incubación con cadmio se puede observar que todas las concentraciones elegidas aumentaron la proliferación celular, siendo este aumento significativamente mayor con la concentración  $10^{-8}$  M, por dicha razón seleccionamos esta concentración de cadmio como la más óptima para los sucesivos experimentos.



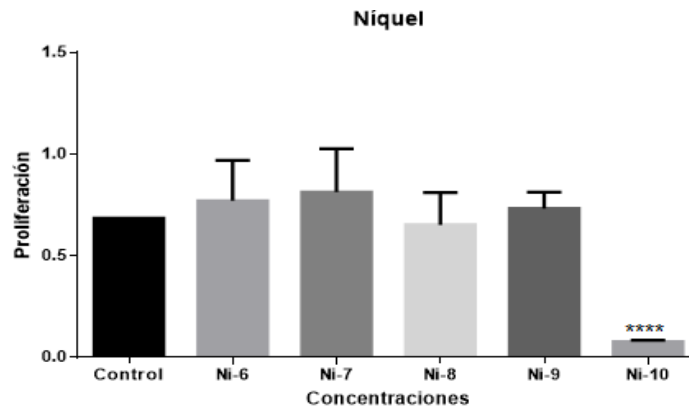
**Figura 6.** Proliferación celular después de la incubación con cromo.\*  $p < 0.05$  respecto al control, \*\*  $p < 0.01$  respecto al control, \*\*\*  $p < 0.005$  respecto al control y \*\*\*\*  $p < 0.001$  respecto al control. Cr-6 – Cr-10: concentraciones ensayadas de cromo desde  $10^{-6}$  hasta  $10^{-10}$

En el caso del cromo podemos ver que la proliferación celular tiene un aumento en la concentración  $10^{-8}M$  por lo que se eligió como óptima. Observamos que en la concentración  $10^{-10}M$ , se produce una disminución en la proliferación, lo que indica que este metal puede inducir apoptosis celular a dicha concentración.



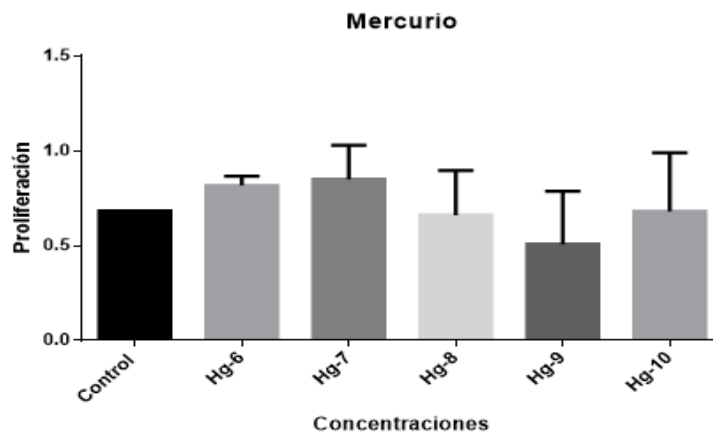
**Figura 7.** Proliferación celular después de la Incubación con plomo. \*\*\* $p < 0.005$  respecto al control, Pb-6 – Pb-10: concentraciones ensayadas de plomo desde  $10^{-6}$  hasta  $10^{-10}$

En los ensayos realizados con plomo se seleccionó la concentración  $10^{-9} M$  como óptima.



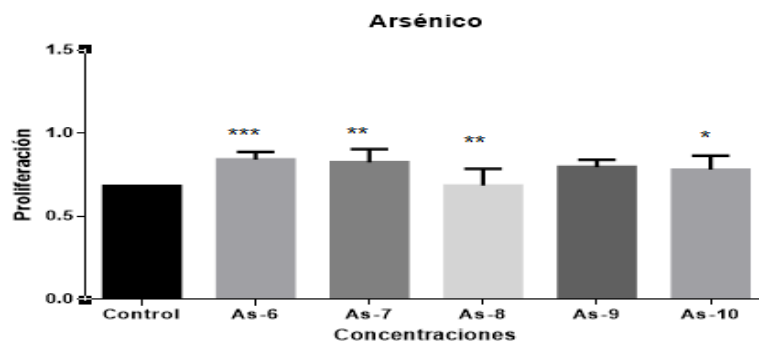
**Figura 8.** Proliferación celular después de la incubación con níquel. \*\*\*\* $p < 0.001$  respecto al control. Ni-6 – Ni-10: concentraciones ensayadas de níquel desde  $10^{-6}$  hasta  $10^{-10}$

Al probar con el níquel se pudo observar que la proliferación celular tiene un aumento mayor con la concentración  $10^{-7}$  M. En la concentración Ni-10 comparada con respecto al control, se descartó el valor numérico, tomando en cuenta el interés de estudio que es evaluar el aumento en la proliferación celular, esto puede ser debido a que el níquel a esta concentración puede inducir apoptosis celular.



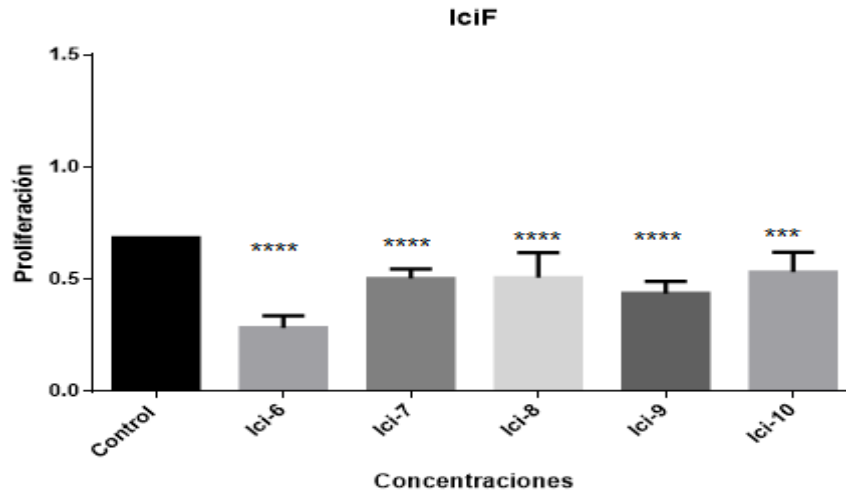
**Figura 9.** Proliferación celular después de la incubación con mercurio, Hg-6 – Hg-10: concentraciones ensayadas de mercurio desde  $10^{-6}$  hasta  $10^{-10}$

Después del tiempo de incubación con mercurio se puede observar que la proliferación celular tiene un aumento en la concentración  $10^{-7}$  M.



**Figura 10.** Proliferación celular después de la Incubación con níquel con arsénico. \* $p < 0.05$  respecto al control, \*\* $p < 0.01$  respecto al control, \*\*\* $p < 0.005$  respecto al control, As-6 – As-10: concentraciones ensayadas de arsénico desde  $10^{-6}$  hasta  $10^{-10}$

Al incubar con arsénico se observó mayor proliferación celular con una concentración de  $10^{-6}$  M.

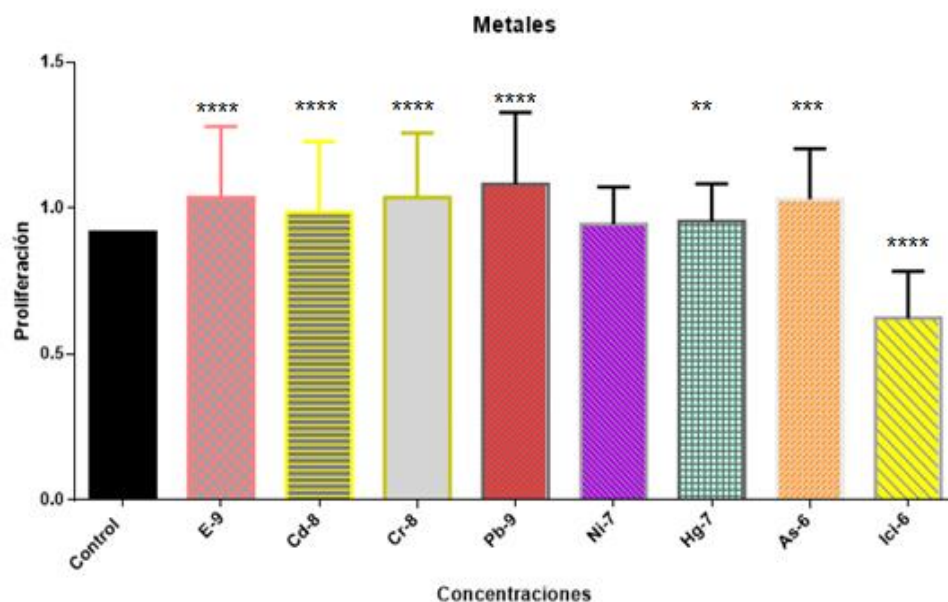


**Figura 11.** Proliferación celular después de la Incubación con ICI fulvestrant. \*\*\* $p < 0.005$  respecto al control y \*\*\*\* $p < 0.001$  respecto al control. Ici-6 – Ici-10: concentraciones ensayadas de ICI Fulvestran desde  $10^{-6}$  hasta  $10^{-10}$

Por último, al probar ICI fulvestrant (control negativo) se puede observar que la proliferación celular disminuye notablemente respecto al control en la concentración  $10^{-6}$  M.

#### 4.1.2 Elección de concentraciones óptimas de metales pesados

Una vez analizados los resultados de proliferación celular para cada uno de los metales, se eligieron las concentraciones óptimas (fig. 12), donde se observó el máximo crecimiento celular, para: Cadmio  $10^{-8}$  (Cd-8), Cromo  $10^{-8}$  (Cr-8), plomo  $10^{-9}$  (Pb-9), níquel  $10^{-7}$  (Ni-7), mercurio  $10^{-7}$  (Hg-7), arsénico  $10^{-6}$  (As-6),. Siendo las concentraciones óptimas de metales pesados que favorecen el crecimiento celular en la línea de cáncer de mama MFC-7, reportadas por Martin et al., (2003), As-6, Ni y Hg-7, Cd y Cr-8, Pb-9.

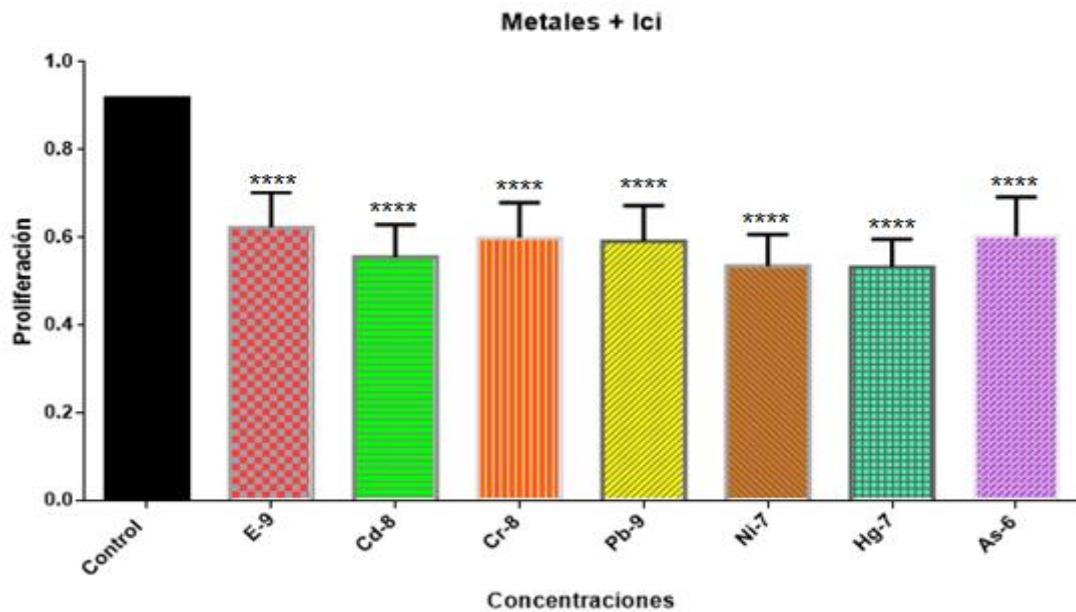


**Figura 12.** Efecto de los diferentes metales pesados sobre la proliferación celular luego de 48 horas de incubación. \*\* $p < 0.01$  respecto al control, \*\*\* $p < 0.005$  respecto al control y \*\*\*\* $p < 0.001$  respecto al control.

En la figura 12 se muestra un aumento en la proliferación de las células de cáncer de mama MCF-7 tras la administración de las diferentes concentraciones de metales pesados elegidas como óptimas, observando un aumento significativo con respecto al control. Siendo los metales: plomo, arsénico y cromo los que produjeron un crecimiento más significativo con respecto al control. Así también, se puede observar que los metales níquel, mercurio y cadmio también ejercen su efecto sobre el crecimiento celular, aunque con una menor intensidad. El estradiol utilizado como control positivo causa un aumento en la proliferación celular; ocurriendo lo contrario con el control negativo ICI fulvestrant que disminuye la proliferación incidiendo en el crecimiento de las células tumorales.

### 4.1.3 Evaluación del efecto estrogénico de metales pesados a través del receptor de estrógenos

Para comprobar el efecto estrogénico que ejercen los metales pesados sobre el RE- $\alpha$  en las células de cáncer de mama MCF-7, empleamos ICI fulvestrant para bloquear dicho receptor, e impedir que los metales pesados ejerzan su efecto incidiendo en la proliferación celular.



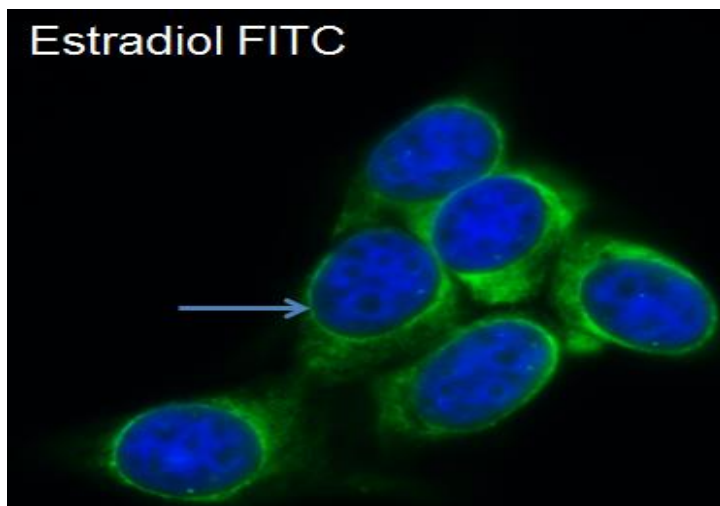
**Figura 13.** Efecto de las diferentes concentraciones de metales pesados + ICI fulvestrant sobre la proliferación celular luego de 48 horas de incubación. \*\*\*\* $p < 0.001$  respecto al control.

En los ensayos de competencia entre el ICI -6 y los diferentes metales pesados ensayados, observamos una disminución significativa en la proliferación de las células de cáncer de mama MCF-7, con respecto al control (negro). Cuando las células son expuestas a tratamientos con metales pesados, estos pueden conducir a necrosis o apoptosis celular, sin embargo, en algunas ocasiones las células pueden experimentar acontecimientos como la síntesis de moléculas de glutatión que podrían conducir a su supervivencia y proliferación celular.

Estudios realizados y reportados han demostrado ampliamente que la exposición a metales pesados interviene en varios mecanismos primarios de toxicidad, incluyendo la producción de especies reactivas de oxígeno, la reacción con tioles intracelulares y la competencia con metales esenciales en sistemas biológicos. Según Egiebor (2013), quien ensayo con concentraciones de arsénico, cadmio, mercurio y plomo entre  $10^{-4}$  y  $10^{-6}$  M, las cuales indujeron proliferación en cultivos de células MCF-7 luego de 40 horas de exposición, en este trabajo se obtuvo el mismo resultados con concentraciones menores de estos metales ( $As^{-6}$ ,  $Cd^{-8}$ ,  $Hg^{-7}$  y  $Pb^{-9}$ ), pero con incubaciones mas prolongadas de 48 horas. Además de estos metales, también el  $Cr^{-8}$  y  $Ni^{-7}$ , como metales divalentes y aniones metálicos, activan el *RE- $\alpha$*  mediante la formación de un complejo dentro del dominio de unión al receptor; aumentando la proliferación celular (Stoica & Katzenellenbogen, 2015). Asimismo, otros estudios demostraron que el cadmio imita muchos de los efectos biológicos del estradiol en células cancerosas (García-Morales et al., 1994).

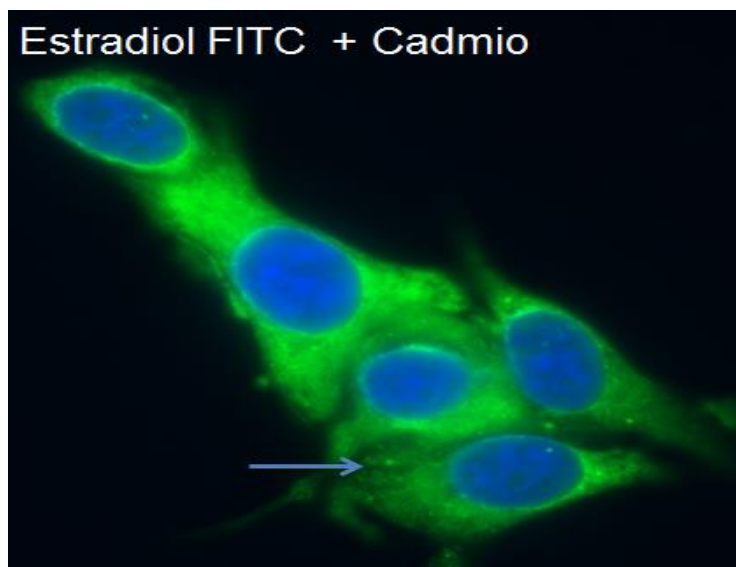
#### **4.1.4 Microscopia de fluorescencia: Competencia entre el estradiol (FITC) y metales pesados por su unión al *RE- $\alpha$***

Todos los ensayos de microscopia de fluorescencia se realizaron por triplicado, utilizando un microscopio de fluorescencia Leica de DMi8, con filtros GFP (488-510nm) y DAPI (461-500nm) y un poder de magnificación de 630X. Se utilizó estradiol marcado con FITC de color verde (E-FITC) y el núcleo fue teñido con DAPI de color azul.



**Figura 14.** Células cultivadas en presencia de estradiol marcado con FITC

En la figura 14 se puede observar el estradiol marcado (verde) unido al *RE- $\alpha$*  en la membrana del núcleo, como se indica con la flecha.

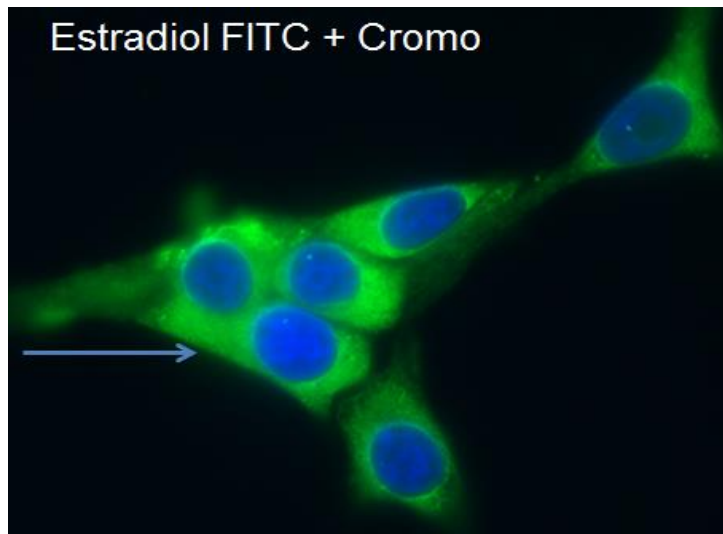


**Figura 15.** Células cultivadas con E-FITC + Cadmio

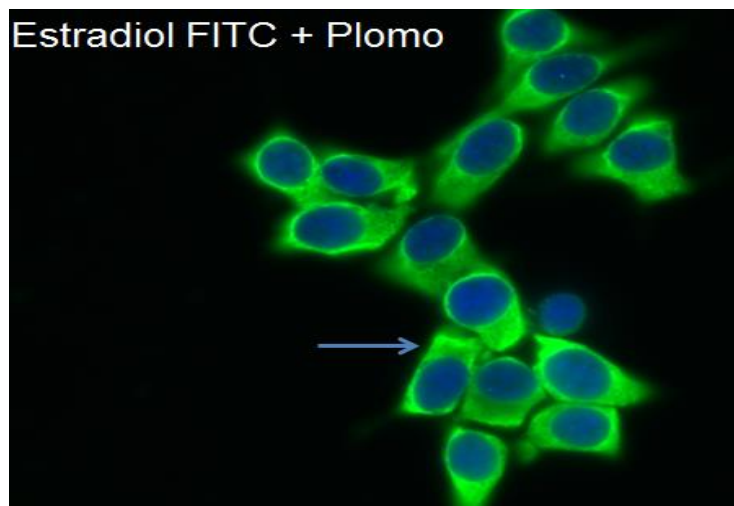
En el caso de las células cultivadas con E-FITC y cadmio, se puede ver que el estradiol ya no aparece en la membrana nuclear, lo que indica que no está unido al *RE- $\alpha$* . Esto se debe a que el cadmio ha competido con el E-



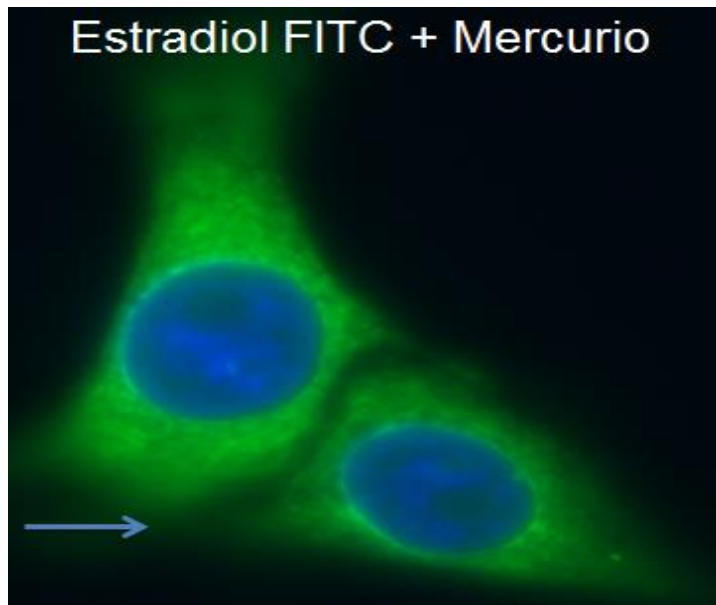
FITC en su unión al *RE-α* y ha sido el cadmio el que se ha unido, por ello el E-FITC aparece en el citoplasma observándose como puntos verdes. Este mismo comportamiento se observó con todos los metales analizados (figura 16-20). Lo que demuestra que todos estos metales se comportan como estrogénicos uniéndose para ejercer su acción al *RE-α*.



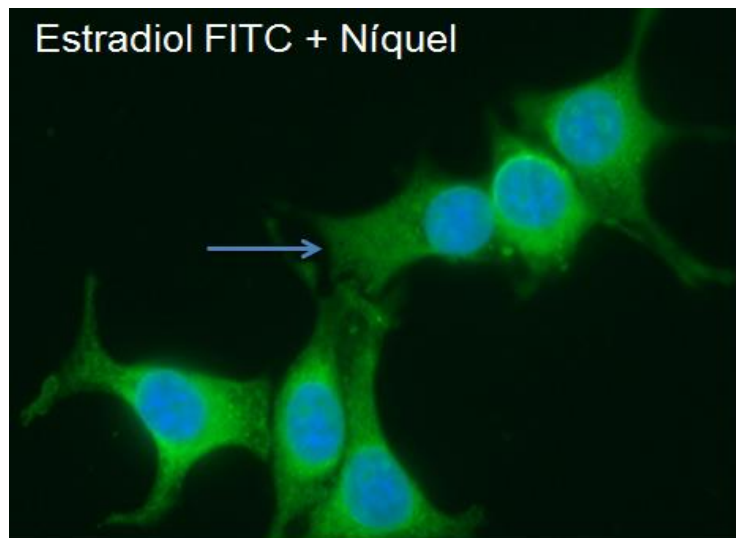
**Figura 16.** Células cultivadas con E-FITC + Cromo



**Figura 17.** Células cultivadas con E-FITC + Plomo



**Figura 18.** Células cultivadas con E-FITC + Mercurio



**Figura 19.** Células cultivadas con E-FITC + Níquel

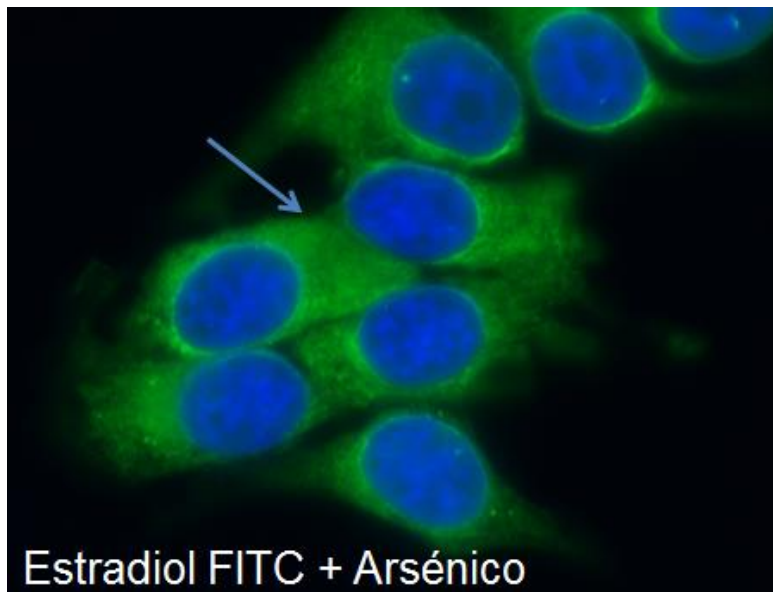


Figura 20. Células cultivadas con E-FITC + Arsénico

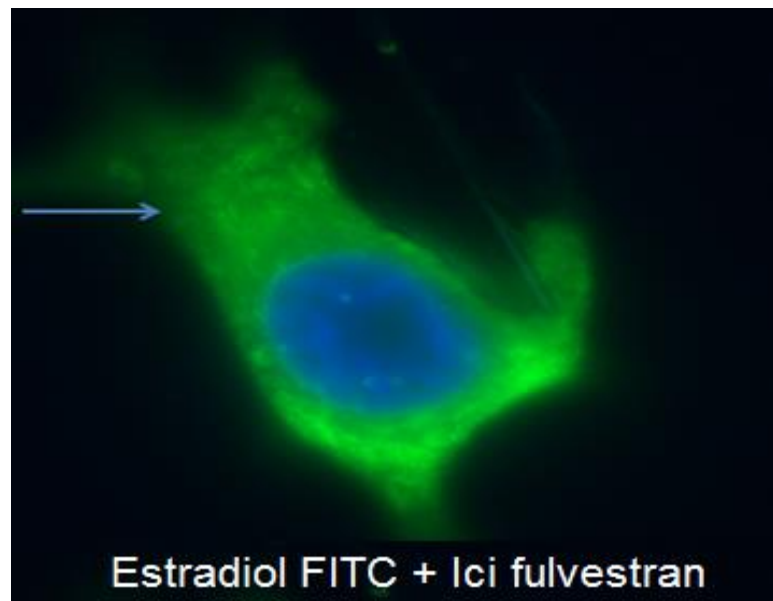


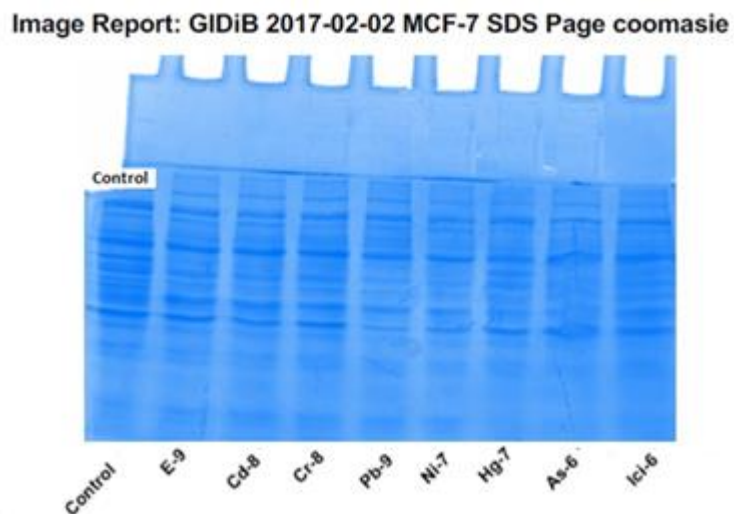
Figura 21. Células cultivadas con E-FITC + ICI fulvestrant

Por último, en la imagen 21, se muestran células cultivadas con E-FITC e ICI fulvestrant, este inhibe o bloquea al  $RE-\alpha$  impidiendo que tanto el estradiol, como los metales pesados se unan a él, por lo que se puede

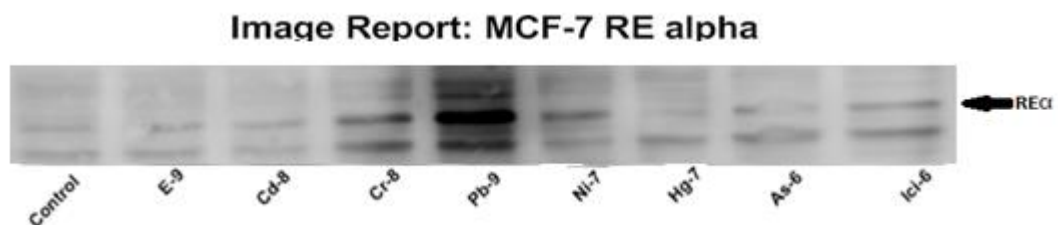
observar que todo el E-FITC se encuentra en el citoplasma y no en la membrana del núcleo. Lo que demuestra una vez más que tanto el estradiol como los metales ejercen su acción en las células MCF-7 uniéndose al RE- $\alpha$ . Es importante resaltar que este tipo de estudio, donde se comprueba la acción de los metales pesados (cadmio, cromo, plomo, níquel, mercurio y arsénico) a través de su unión al RE- $\alpha$  y la competencia que existe entre estos metales y el estradiol por su unión a dicho receptor con microscopía de fluorescencia, es primera vez que se reporta.

#### 4.1.5 Expresión del RE- $\alpha$ por Western Blot

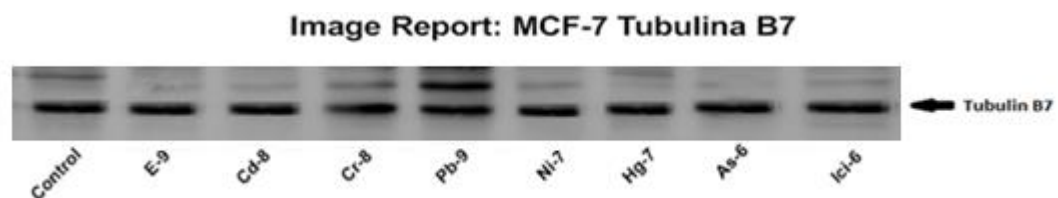
En los Western Blot realizados a partir de proteínas obtenidas de lisado celular (MCF-7) tratados con los diferentes metales se observó un aumento en la expresión del RE- $\alpha$  en el caso del Cr-8, Pb-9, Ni-7 (fig. 23). Se comprobó que la cantidad de proteínas cargadas en el gel SDS/PAGE para las células tratadas con los diferentes metales fue la misma mediante el uso del Ac anti tubulina (fig. 24).



**Figura 22.** Electroforesis SDS/PAGE teñida con azul coomassie, se observa integridad en las bandas y una separación uniforme de las proteínas cuando fueron sometidas a un campo eléctrico.



**Figura 23.** Western Blot utilizando un anticuerpo monoclonal de ratón anti RE- $\alpha$  marcado con Alexa Fluor 488 (C-3 Santa Cruz Biotechnology, Inc) a una dilución: 1/250. Se puede verificar un aumento en la expresión del RE- $\alpha$  (66 y 54 kd) en el tratamiento con plomo, níquel y cromo, en relación al control.



**Figura 24.** Western Blot usando un anticuerpo monoclonal de ratón anti Tubulin marcado con Texas red Cy5.5 (B-7 Santa Cruz Biotechnology, Inc) a una dilución de 1/500. Se puede observar que fue cargada en el gel SDS/PAGE la misma cantidad de proteínas extraídas del núcleo de las células MCF-7 con los diferentes tratamientos de metales pesados.

#### **4.1.6 Cuantificación de la expresión del gen del RE- $\alpha$ mediante Transcripción Reversa y PCR en Tiempo Real (RT-qPCR)**

Para llevar a cabo la cuantificación de la expresión del RE- $\alpha$  en células MCF-7, se utilizó ARN extraído luego de haber incubado las células con los diferentes tratamientos, todos los ensayos fueron realizados por triplicado.

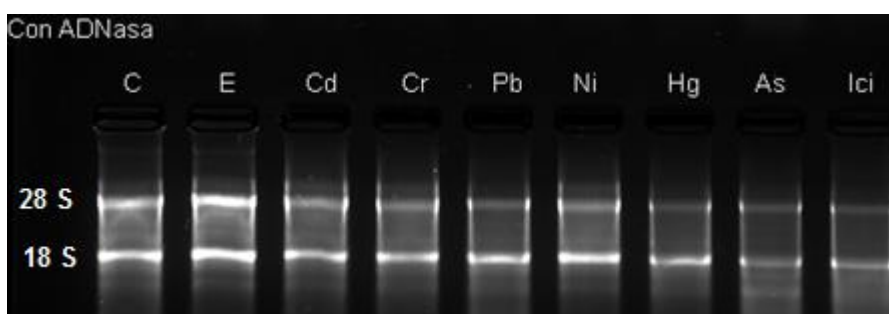
##### **4.1.6.1 Cuantificación de ARN total, tras cultivar las células MCF-7 con las diferentes concentraciones óptimas de metales pesados.**

Los ARNs obtenidos presentaron concentraciones entre: 0,83 – 1,58 ug/ul y relaciones 260/280 y 260/230 en los límites aceptados como ARN puro (tabla II). Para eliminar el ADN contaminante se trató el ARN con la enzima DNAasa I y el resultado fue verificado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5% (tabla II) (fig. 25).

**Tabla II. “Concentración y pureza del ARN obtenido antes y después del tratamiento con DNAasa I.”**

Muestra	Conc. ARN	Unidad	260/280	260/230
control	0,9585	µg/µl	2,11	2,23
estradiol	1,5818	µg/µl	2,11	2,22
cadmio	1,1413	µg/µl	2,1	1,51
chromo	1,2171	µg/µl	2,08	2,12
plomo	1,0391	µg/µl	2,07	2,07
níquel	1,2652	µg/µl	2,09	2,08
mercurio	0,9215	µg/µl	2,05	2,15
arsénico	1,3993	µg/µl	2,07	2,12
ici	0,8327	µg/µl	2,05	2,03
control T	0,0874	µg/µl	2,08	2,01
estradiol T	0,0726	µg/µl	2,11	2
cadmio T	0,0877	µg/µl	2,08	1,44
chromo T	0,0858	µg/µl	2,05	1,92
plomo T	0,0978	µg/µl	2,06	1,43
níquel T	0,1046	µg/µl	2,04	1,92
mercurio T	0,1003	µg/µl	2,03	1,46
arsénico T	0,1087	µg/µl	2,04	1,7
Ici T	0,1021	µg/µl	2,04	1,45

Nota: T: ARN tratado con DNAasa I

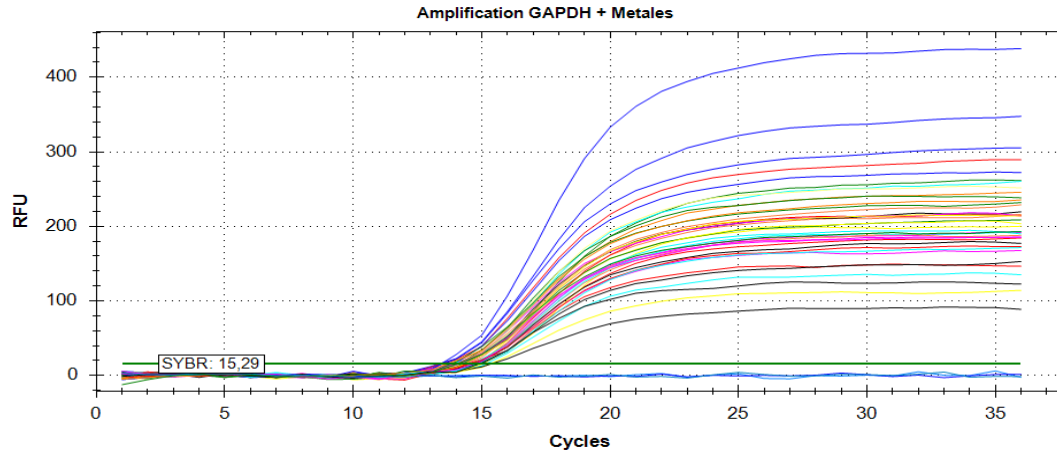


**Figura 25.** Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de 2 µg de ARN tratado con la enzima DNAasa I, en el que se descarta la presencia de ADN genómico contaminante.

#### 4.1.7 Validación del uso del gen de referencia *GAPDH* mediante la determinación del Ct.

Para evaluar si la expresión genética del gen de referencia *GAPDH* se ve afectada por la presencia de los diferentes metales pesados utilizados durante el cultivo celular, se realizó la RT-qPCR con diferentes concentraciones de ARN (fig. 26, Tabla III), como se describe en la metodología y se aplicó un ANOVA

con post test de comparación múltiple Tukey Kramer, además, de un análisis de varianza.

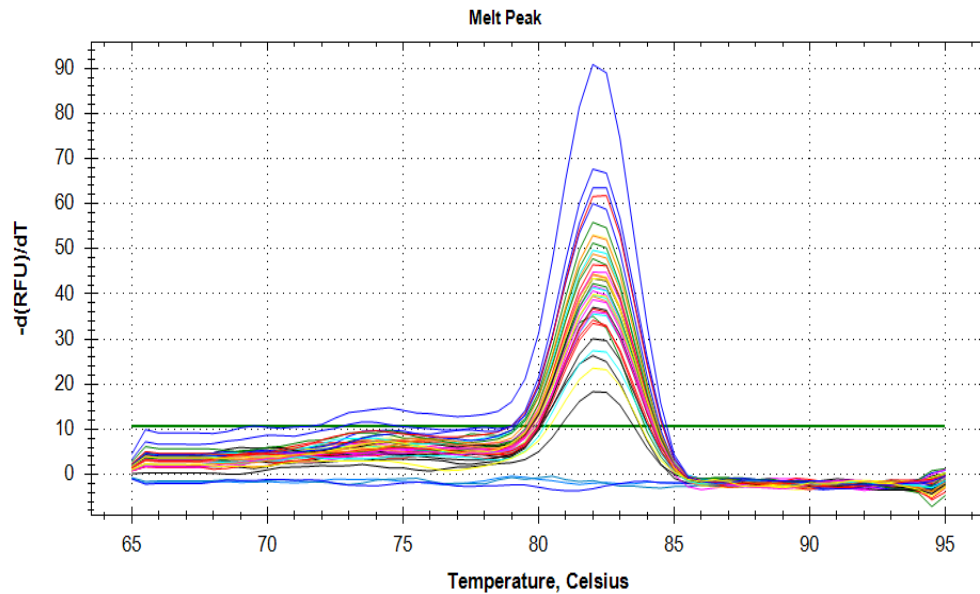


**Figura 26.** Gráfica de normalización del Ct obtenido de la amplificación del gen de referencia *GAPDH* del control (amarillo), y las células MCF-7 tratadas con: estradiol (celeste), cadmio (rojo), cromo (café), plomo (magenta), níquel (rosado), mercurio (negro), arsénico (verde), NTC (Blanco) 1 y 2 (azul)

**Tabla III. “Ct obtenidos a partir de las diferentes diluciones del ARN extraído de las células tratadas con los metales.”**

Tratamiento	Ct					Media
<b>Control</b>	15.30	14.65	15.01	14.13	14.29	14.68
<b>Estradiol</b>	13.31	13.89	13.46	13.51	13.40	13.51
<b>Cadmio</b>	13.40	14.73	14.48	14.41	14.50	14.30
<b>Cromo</b>	13.72	14.32	14.76	14.00	13.62	14.08
<b>Plomo</b>	15.14	13.84	14.72	14.60	14.82	14.62
<b>Níquel</b>	14.69	14.35	13.94	14.07	14.67	14.35
<b>Mercurio</b>	15.34	14.25	14.70	14.86	14.86	14.80
<b>Arsénico</b>	14.34	14.15	14.10	13.77	14.02	14.08

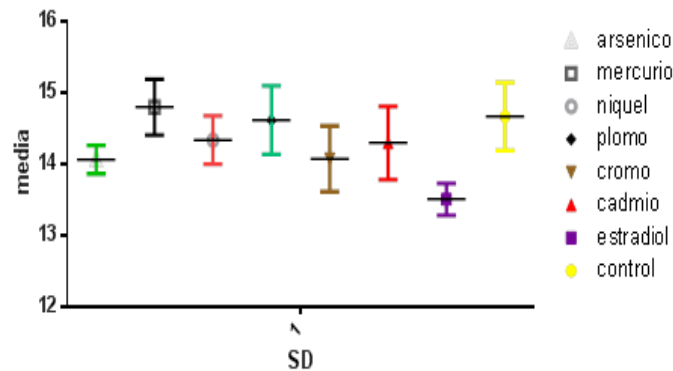
Mediante curvas de disociación pudimos comprobar la ausencia de fragmentos inespecíficos, ya que se obtuvo una única Tm de aprox. 82,0 °C (82,0 - 82,5 °C) (fig. 28).



**Figura 27.** Curvas de disociación del producto amplificado del gen de referencia *GAPDH* del control y las muestras tratadas. Se observa un único pico correspondiente al amplicon específico ( $T_m$ : 82,0 °C).

Cuando se comparó el estradiol vs control se encontró una diferencia significativa. El valor del estadístico  $p=0,0004$  para el grupo de datos y el valor crítico  $F$  5.26, con un nivel de confianza del 95%, permitió determinar que no existen diferencias significativa en la expresión genética del gen *GAPDH* cuando se somete al tratamiento con metales pesados comparado con el control, ya que no existen variaciones importantes en los valores del  $C_t$  (fig. 29).





**Figura 28.** Análisis de varianza del Ct obtenido para gen *GAPDH* en el control y las muestras tratadas. Se pudo validar *GAPDH* como gen de referencia para este estudio, ya que no se detectaron diferencias significativas entre el Ct del control vs tratamientos con metales en las diferentes diluciones.

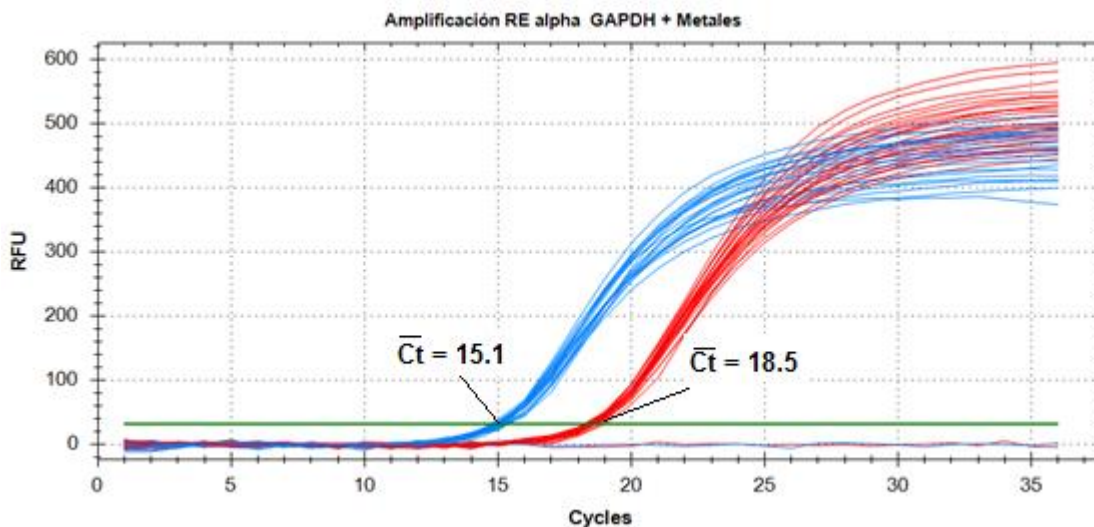
#### 4.1.8 “Cuantificación relativa de la expresión del gen RE- $\alpha$ utilizando el método $\Delta\Delta Ct$ ”

Para el análisis de la expresión del gen RE- $\alpha$  se utilizó el método de  $\Delta\Delta Ct$  descrito por (Livak & Schmittgen, 2001). Con los valores de Ct obtenidos en los ensayos se aplicó la fórmula de cálculo de expresión génica:

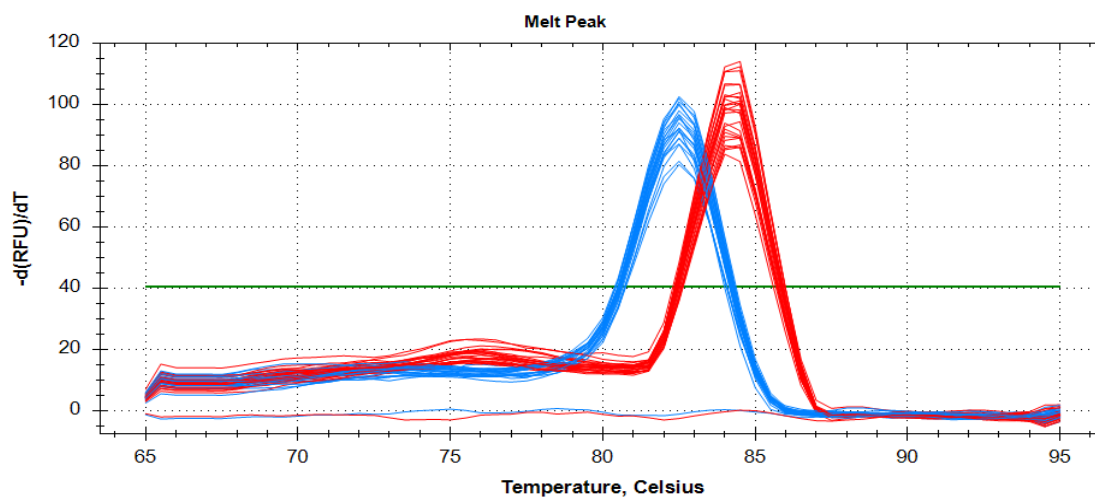
$$Exp = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_m - \Delta Ct_b$$

Donde el  $\Delta Ct_m$  es la diferencia de Ct entre las células tratadas con los diferentes metales menos el Ct obtenido de la muestra sin tratamiento (control), al amplificar el gen RE- $\alpha$ . El  $\Delta Ct_b$ , en cambio es el  $\Delta Ct$  obtenido al amplificar el gen de referencia *GAPDH*. Una vez que los valores de  $\Delta Ct$  fueron calculados, se hizo una corrección logarítmica para minimizar la varianza de los valores, por la naturaleza exponencial de la curva de qPCR.



**Figura 29.** Amplificación mediante RT- qPCR del gen de referencia *GAPDH* y del gen *RE- $\alpha$*  a partir de ARN extraído de células MCF-7 control y en presencia de metales pesados. Se observa un  $\bar{C}_t$  medio: 15,1 (color azul) para el gen de referencia *GAPDH* y un  $\bar{C}_t$  medio: 18,5 (color rojo) del gen diana *RE- $\alpha$* .

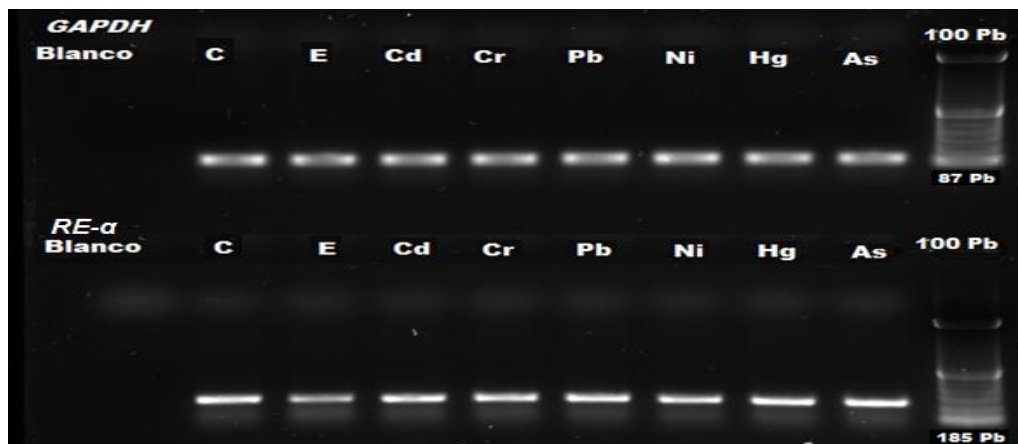


**Figura 30.** Curvas de disociación de los amplicones obtenidos del gen de referencia *GAPDH* y del gen *RE- $\alpha$*  a partir del control y las muestras tratadas. Los amplicones específicos obtenidos presentan una  $T_m$ : 83,0 °C para *GAPDH* y 84,0 °C para *RE- $\alpha$* .

Se puede decir que a partir de la curva de disociación se determinó el derivado de pico para cada isoforma / variante con respecto a la temperatura de fusión

(Tm) (Figura 30). Si se obtiene más de un pico a las temperaturas de fusión más altas, entonces esto indica la presencia de variantes para el gen específico de interés. Además, el derivado de pico proporciona una estimación del grado de expresión de un gen específico, cuanto mayor sea el pico, mayor será la expresión, con la condición de que el ARN tratado con DNasa inicial sea uniforme para todas las muestras tratadas y el control no tratado, lo cual es el caso en nuestro estudio. El GAPDH se utilizó como control interno, en todas las muestras tratadas, que fueron comparadas con respecto al control es decir, no se detectó contaminación de ADN genómico.

Además del análisis de disociación, que nos permite verificar la presencia de un solo producto de amplificación, tanto para el gen *RE-α*, como para *GAPDH*, así como descartar la formación de productos inespecíficos, dímeros de primers, que podrían llegar a originar valores erróneos de Ct, se verificó la presencia de un solo fragmento de amplificación de cada uno de los genes mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, en presencia de SYBR Safe (fig. 31).



**Figura 31.** Electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, en el que se puede observar el producto de amplificación del gen de referencia *GAPDH* con un amplicón de 87pb, mientras que para el gen *RE-α* fue de 185 pb, comprobando la ausencia de contaminaciones y productos inespecíficos.

**Tabla IV. “Ct por triplicado y medias obtenidos mediante RT-qPCR a partir del gen de referencia *GAPDH* con los diferentes tratamientos.”**

Muestras	Ct			Ct media
Control	14,83	15,82	14,97	15,20
Estradiol	14,88	14,70	16,20	15,26
Cadmio	15,30	15,00	15,04	15,11
Cromo	15,11	15,17	15,06	15,11
Plomo	15,23	15,08	15,21	15,17
Níquel	14,98	15,15	15,25	15,12
Mercurio	14,88	14,87	14,96	14,90
Arsénico	15,40	15,24	15,14	15,26
Ici_Fulvestran	15,03	15,03	15,03	15,03

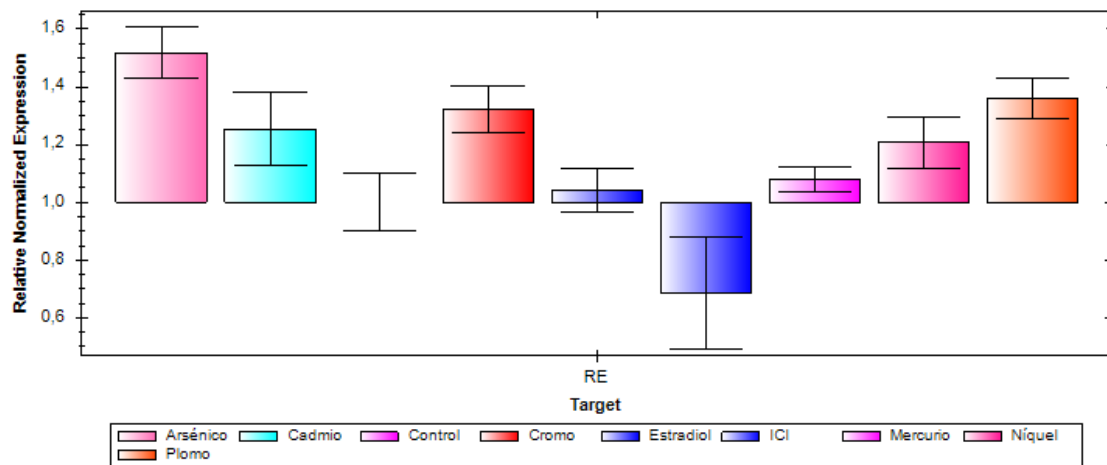
Tabla V. “Ct por triplicado y medias obtenidos mediante RT-qPCR a partir gen diana *RE- $\alpha$*  con los diferentes tratamientos.”

Muestras	Ct			Ct media
Control	18,65	18,56	18,85	18,68
Estradiol	18,42	18,27	18,53	18,40
Cadmio	18,32	18,69	18,38	18,46
Cromo	18,22	18,49	18,46	18,39
Plomo	18,44	18,40	18,31	18,38
Níquel	18,49	18,32	18,59	18,46
Mercurio	18,58	18,41	18,43	18,47
Arsénico	18,49	18,87	18,32	18,32
Ici_Fulvestran	19,01	19,81	19,00	19,27

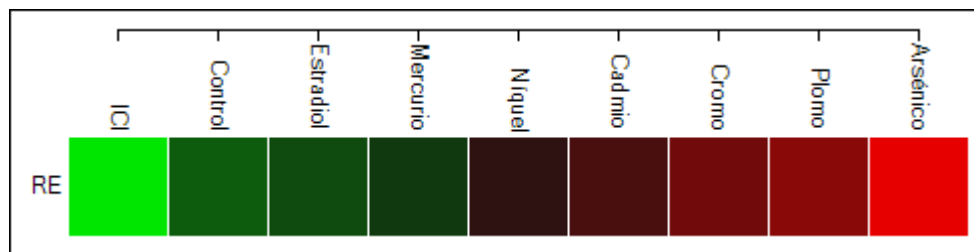
Tabla VI. “Niveles de expresión relativa obtenidos según el método  $\Delta\Delta Ct$ .”

Diana	Muestra	Expresión	Media Ct
RE- $\alpha$	Arsénico	1,51864	18,39
RE- $\alpha$	Cadmio	1,25284	18,46
RE- $\alpha$	Control*	1,00000	18,68
RE- $\alpha$	Cromo	1,32072	18,39
RE- $\alpha$	Estradiol	1,04125	18,41
RE- $\alpha$	ICi Fulvestran	0,68576	19,41
RE- $\alpha$	Mercurio	1,07906	18,47
RE- $\alpha$	Níquel	1,20784	18,47
RE- $\alpha$	Plomo	1,36078	18,39

En la presente tabla se puede observar, un aumento en la expresión genética del *RE-α* en las células MCF-7 tratadas comparadas con el control. En las células tratadas con arsénico se observa un aumento de la expresión relativa de 1,52 veces, seguido de los metales plomo con 1,36 y cromo 1,32. Con los metales cadmio y níquel sólo se observó un pequeño aumento de 1,25 y 1,21 veces, mientras que el mercurio 1,08 (tabla VI, figura 32). También se observa la inhibición que produce el medicamento ICi Fulvestran sobre el *RE-α* con una expresión de 0.68 veces menor comparada con el control. El aumento en los niveles de expresión del gen obtenidos con los diferentes metales pueden deberse a su unión en distintas sub unidades del *RE* (Lappano, et al., 2016)



**Figura 32.** Expresión relativa normalizada del gen *RE-α*, según el método  $\Delta\Delta Ct$ , donde se compara el control vs los diferentes tratamientos. Se observa un mayor aumento en la expresión genética; cuando las células son tratadas con arsénico seguido de plomo y cromo.



**Figura 33.** *Clustergram*: muestra los niveles de expresión del gen *RE- $\alpha$*  de menor a mayor comparado con el control.

En general, el *RE* se activa cuando el estrógeno se une a él, siendo capaz de producir la transcripción de genes que participan en el control del crecimiento y proliferación celular, asimismo, otros ligandos producen el mismo efecto como: el estradiol, metales pesados, e ICi fulvestran. Dos receptores de estrógeno que cumplen esta función han sido identificados, el *RE- $\alpha$*  y el *RE- $\beta$* , en conjunto con una serie de proteínas activadoras y represoras. Así como, esteroides que producen efectos rápidos y estimulan señales intracelulares. Estos efectos “no genómicos” son mediados por receptores de membrana, sin embargo, la identidad de estos receptores no ha sido descrita aún. La existencia de los receptores nucleares como el *RE- $\alpha$* , son de gran interés, ya que tienen una afinidad 5 veces mayor por el estradiol que los *RE- $\beta$* . In vitro; ambos receptores forman heterodímeros, y el *RE- $\beta$*  disminuye la sensibilidad del *RE- $\alpha$*  al estrógeno, actuando como un regulador fisiológico de los efectos proliferativos del *RE- $\alpha$* . (Márquez, 2007).

Debido a que el *RE* es un mediador crítico del crecimiento, las moléculas que pueden unirse a él y activarlo suelen ser sustancias químicas naturales y artificiales que poseen actividad estrogénica, siendo un factor importante en el desarrollo del cáncer de mama. Estudios previos sugieren que el metal pesado, cadmio, es un nuevo estrógeno ambiental, que imita los efectos del estradiol en la línea celular MCF-7, sensible a los estrógenos. (Stoica & Katzenellenbogen, 2015). En este sentido, los diferentes metales pesados utilizados en el presente

trabajo, en ensayos de proliferación celular y microscopia de fluorescencia, podrían actuar de manera similar al cadmio, produciendo un aumento en la expresión del *RE*, como lo descrito por (Stoica & Katzenellenbogen, 2015).

#### 4.2 Verificación de hipótesis

Los metales pesados actúan como agentes estrogénicos, aumentando la proliferación en las células de cáncer de mama MCF-7, bajo las condiciones experimentales propuestas en este trabajo.

#### Hipótesis Nula

Los metales pesados no son agentes estrogénicos y por lo tanto no aumentan la proliferación celular, bajo nuestras condiciones experimentales.

#### Hipótesis Alternativa

Los metales pesados son agentes estrogénicos y por lo tanto aumentan la proliferación celular, bajo nuestras condiciones experimentales.

**Tabla VII. “Análisis estadístico Chi-cuadrado (X2) GraphPad Prism 6.0”**

	Control	Estradiol	Cd	Cr	Pb	Ni	Hg	As	IciF
valores	1	48	48	48	48	48	48	48	48
mínimos	0,9180	0,5840	0,5660	0,6300	0,6520	0,672	0,7150	0,7030	0,4430
25% percentiles	0,9180	0,7505	0,7000	0,8025	0,8143	0,841	0,8110	0,8388	0,5003
media	0,9180	1,153	1,114	1,154	1,210	0,9510	1,015	1,091	0,6070
75% percentiles	0,9180	1,237	1,158	1,214	1,275	1,027	1,063	1,166	0,7190
máximos	0,9180	1,303	1,280	1,290	1,374	1,168	1,139	1,290	1,209
media	0,9180	1,038	0,9868	1,037	1,083	0,946	0,9557	1,032	0,6242
Std. desviación	0,0	0,2422	0,2422	0,2216	0,2448	0,126	0,1282	0,1731	0,1607
Std. error media	0,0	0,03496	0,0349	0,0319	0,0353	0,018	0,0185	0,0249	0,0231
L 95% CI of media	0,0	0,9674	0,9164	0,9729	1,012	0,909	0,9185	0,9815	0,5776
U 95% CI of media	0,0	1,108	1,057	1,102	1,154	0,982	0,9929	1,082	0,6709
D'Agostino & Pearson									
K2		24,68	23,98	25,53	28,65	0,87	10,00	15,47	32,48
<b>P valor</b>		< 0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,646	<0,0067	<0,0004	<0,0001
Normalidad (alfa=0.05)		No	No	No	No	Yes	No	No	No
P resumen		***	***	***	***	ns	**	***	***
suma	0,9180	49,81	47,36	49,79	52,00	45,41	45,87	49,52	29,96

Análisis de crecimiento de las células de cáncer de mama MCF-7, en presencia de metales pesados Cd, Cr, Pb, Ni, Hg, As, para la prueba Chi-cuadrado ( $X^2$ ), el valor  $p$  calculado es menor a 0,05; por lo tanto se acepta la hipótesis alternativa la cual indica que los metales pesados son agentes estrogénicos y por lo tanto aumentan la proliferación celular, bajo nuestras condiciones experimentales.

**Los Metales pesados producen un aumento en la expresión del receptor de estrógenos en las células de cáncer de mama MCF-7, bajo las condiciones experimentales propuestas en este trabajo.**

**Hipótesis Nula**

Los metales pesados no aumentan la expresión del *RE- $\alpha$*  en las células, bajo nuestras condiciones experimentales.

**Hipótesis Alternativa**

Los metales pesados aumentan la expresión del *RE- $\alpha$*  en las células, bajo nuestras condiciones experimentales.

Análisis de la expresión genética en células de cáncer de mama MCF-7, en presencia de metales pesados Cd, Cr, Pb, Ni, Hg, As, para la prueba Chi-cuadrado ( $X^2$ ), el valor  $p$  calculado es menor a 0,05; por lo tanto se acepta la hipótesis alternativa la cual indica que los metales pesados aumentan la expresión genética del *RE- $\alpha$*  en las células, bajo nuestras condiciones experimentales.



**Existe competencia entre los metales pesados y el estradiol por su unión al  $RE-\alpha$ .**

**Hipótesis Nula**

Los metales pesados no compiten con el estradiol por su unión al RE.

**Hipótesis Alternativa**

Los metales pesados compiten con el estradiol por su unión al RE.

Una vez aplicada la técnica de Microscopia de fluorescencia, se pudo demostrar la hipótesis alternativa: En donde los metales pesados compiten con el estradiol por su unión al receptor de estrógenos.

## CAPÍTULO V

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 5.1 Conclusiones

- Es importante evaluar el posible papel estrogénico de metales pesados en cultivos de células de cáncer de mama MCF-7, ya que en nuestro país como en muchos de América del Sur existen fuentes, agentes contaminantes entre otros que inciden en el desarrollo de este tipo de cáncer
- Al determinar las condiciones óptimas, a las que diferentes concentraciones de metales pesados, número de células y tiempo de incubación, que inciden en la proliferación de las células cancerígenas MCF-7, se logró establecer que existen concentraciones para alterar el ciclo celular y favorecer al desarrollo del tumor.
- Se Evaluó el efecto de la concentración elegida para cada uno de los metales pesados e inhibidor del receptor de estrógenos sobre la proliferación celular de células de cáncer de mama MCF-7, teniendo como resultado una disminución en la proliferación celular debido a que el ICI fulvestrant. bloquea el receptor de estrógenos  $RE\alpha$ , impidiendo que los metales pesados se unan.
- Verificamos que si se produce un aumento en la expresión del receptor de estrógenos alfa  $RE\alpha$  en las células cancerígenas MCF-7, tras cultivarlas con las diferentes concentraciones de metales pesados, usando Western blot y el análisis de qRT-PCR en tiempo real.
- También se comprobó que si existe competencia entre el estradiol y los metales pesados por su unión al  $RE\alpha$  en las células cancerígenas MCF-7

## 5.2 Recomendaciones

- El SYBR Green resultó eficiente para la amplificación y el cálculo de la expresión génica relativa del gen  $RE\alpha$ , sin embargo, se puede comprobar los resultados con otras tecnologías de PCR en tiempo real, especialmente con sondas TaqMan, ya que es la tecnología más comúnmente utilizada.
- Continuar con la investigación ya que nos ayudará a reducir un enorme gasto en sanidad, disminuyendo los gastos en tratamientos médicos, medicamentos, consultas y un gran desembolso económico para el gobierno ecuatoriano.
- Desarrollar nuevas terapias, contra el cáncer de mama enfocada al sitio de unión del (RE) donde se unen los metales pesados.
- Compartir estos resultados beneficiando a, líneas de trabajo en epidemiología y salud pública tanto en temas de oncología como de toxicología y contaminación.
- Crear conciencia en autoridades y ciudadanos, mejorando la calidad de sus aguas, tomando medidas oportunas en temas de medioambiente y salud.

## MATERIALES DE REFERENCIA

### Referencias Bibliográficas

- Anderson, B. O., Yip, C., Ramsey, S., Bengoa, R., Braun, S., Fitch, M., ... Tsu, V. D. (2007). La iniciativa global de salud de la mama, *13*, 62–82.
- Bao, Y. I., Wang, A., & Mo, J. (2016). S100A8 / A9 is associated with estrogen receptor loss in breast cancer, *3*, 1936–1942. <http://doi.org/10.3892/ol.2016.4134>
- Cammarata-scalisi, F., Petrosino, P., Balza, M., De, A. A., Milano, M., Stock, F., & Valderrama-landaeta, J. L. (2008). Determinación de los receptores hormonales en cáncer de mama, *2*, 70–76.
- Chomczynski, P., & Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, *162*(1), 156–159. [http://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90021-](http://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90021-)
- Cañizares V., R. O. (2000). Biosorción de metales pesados mediante el uso de biomasa microbiana. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, *42*:131-143, 131–143. Retrieved from <http://www.medigraphic.com/pdfs/lamicro/mi-2000/mi003f.pdf>
- Cultek, 2007. (2007). Cultivos Celulares. *Documento De Aplicacion*, 13–15. Recuperado:[http://www.cultek.com/aplicaciones.asp?p=Aplicacion\\_Cultivos\\_Celulares&opc=tecnica](http://www.cultek.com/aplicaciones.asp?p=Aplicacion_Cultivos_Celulares&opc=tecnica)
- Denizot, F., & Lang, R. (1986). Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. *Journal of Immunological Methods*, *89*(2), 271–277. [http://doi.org/10.1016/0022-1759\(86\)90368-6](http://doi.org/10.1016/0022-1759(86)90368-6)
- Egiebor, E., Tulu, A., Abou-Zeid, N., Aighewi, I. T., & Ishaque, A. (2013). The kinetic signature of toxicity of four heavy metals and their mixtures on mcf7 breast cancer cell line. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *10*(10), 5209–5220. <http://doi.org/10.3390/ijerph10105209>

- García Vidal, A., & Gonzáles Cabeza, V. (2015). Melatonina como modulador de la expresión de angiopoyetinas en células HUVEC y MCF7. *UC Universidad de Cantabria*, Recuperado:<http://repositorio.unican.es/xmlui/bitstream/handle/10902/7677/GarciaVidalA.pdf?sequence=1>
- Garcia-Morales, P., Kenneyq, N., Kim, N., Salomonq, D. S., Gottardisnll, M. M., Solomonn, H. B., ... Martin, M. B. (1994). Effect of Cadmium, 269(24), 16896–16901
- Hellemans, J., Mortier, G., De Paepe, A., Speleman, F., & Vandesompele, J. (2007). qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biology*, 8(2), R19. <http://doi.org/10.1186/gb-2007-8-2-r19>
- IARC (2004). IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans.
- Jenkins, C., Pearce, M. C., Smith, A. W., Knight, H. I., Shaw, D. J., Cheasty, T., ... Frankel, G. (2003). Detection of Escherichia coli serogroups O26, O103, O111 and O145 from bovine faeces using immunomagnetic separation and PCR/DNA probe techniques. *Letters in Applied Microbiology*, 37(3), 207–212. <http://doi.org/10.1046/j.1472-765X.2003.01379.x>
- Kibria, G., Hossain, M., Mallick, D., Lau, T. C., & Wu, R. (2016). Chemosphere Monitoring of metal pollution in waterways across Bangladesh and ecological and public health implications of pollution. *Chemosphere*, 165, 1–9. <http://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.08.121>
- Lappano, R., Malaguarnera, R., Bel, A., & Maggiolini, M. (2016). Molecular and Cellular Endocrinology Recent advances on the stimulatory effects of metals in breast cancer. <http://doi.org/10.1016/j.mce.2016.10.017>
- Leb, V., Stocher, M., Valentine-Thon, E., Holzl, G., Kessler, H., Stekel, H., & Berg, J. (2004). Fully Automated, Internally Controlled Quantification of

- Hepatitis B Virus DNA by Real-Time PCR by Use of the MagNA Pure LC and LightCycler Instruments. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(2), 585–590. <http://doi.org/10.1128/JCM.42.2.585-590.2004>
- Linamaría Escobar M. Fabio A. Aristizábal G. (2010). Fluorometric assay for cell proliferation in human tumor cell lines application. *Vitae*, 17(2), 173–180. Recuperado:<https://aprendeonline.udea.edu.co/revistas/index.php/vitae/article/view/6342>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real- Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  Method, 408, 402–408. <http://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Marienfild. (2010). Cámara de recuento. Recuperado de: [www.marienfild-superior.com/index.php/manuals.html?file](http://www.marienfild-superior.com/index.php/manuals.html?file)
- Martin, M. B., Reiter, R., Pham, T., Avellanet, Y. R., Camara, J., Lahm, M., ... Stoica, A. (2003). Estrogen-like activity of metals in MCF-7 breast cancer cells. *Endocrinology*, 144(6), 2425–2436. <http://doi.org/10.1210/en.2002-221054>
- Márquez, D. C. (2007). Receptor de Estrógeno: Bases Moleculares Aplicadas a Medicina. 2, p. 13. Los Angeles.
- Nilsson, S., Ma, S., Treuter, E., Tujague, M., & Thomsen, J. (2001). Mechanisms of Estrogen Action. *Physiol. Rev.*, 81(4), 1535–65.
- Muñoz R, (2014). Sociedad de Lucha Contra el Cáncer/ Registro Nacional de Tumores, Capítulo Cáncer de mama pag. 111 a 117. Cueva Yopez. editores.Epidemiología del Cáncer Quito 2006-2010. Quito 15ed.
- Philip H. Kass, PhD, P. (2014). Breast Cancer and Metals: A Literature Review. *Department of Population Health & Reproduction*, 2, 33. Retrieved from [http://zerobreastcancer.net/research/metals\\_bc.pdf](http://zerobreastcancer.net/research/metals_bc.pdf)

- Rivas, F., et al. "Análisis de la expresión del gen PR-1, mediante la técnica de PCR en tiempo real (RT-PCR), en tomate (*Solanum lycopersicum*) infectado con *Phytophthora infestans*." Previa a la obtención de Grado Académico o Título de Ingeniero en Biotecnología (2010).
- Segretín, M. E. (2003). Los cultivos celulares y sus aplicaciones I (cultivos de células animales). *Argen Bio*. Recuperado: <http://www.argenbio.org/adc/uploads/pdf/Cultivos celulares I Euge.pdf>
- Stephenson, F. H. (2012). No Title. In S. A. E. ESPAÑA (Ed.), *Cálculo en biología molecular y biotecnología + StudentConsult en español* (p. 532)
- Stoica, A., & Katzenellenbogen, B. S. (2015). Activation of Estrogen Receptor- $\alpha$  by the Heavy Metal Cadmium, (March), 545–553.
- Tsutsumi O: Assessment of human contamination of estrogenic endocrine-disrupting chemicals and their risk for human reproduction. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2005; 93: 325–30
- Valls-Llobet, C. (2010). Contaminación ambiental y salud de las mujeres. *Investigaciones Feministas*, 1, 149–159.
- Wohl, H. M. (2014). Breastcancer.org. Breastcancer, 1, 3. Retrieved from [http://www.breastcancer.org/es/sintomas/cancer\\_de\\_mama/que\\_es\\_cancer\\_mama](http://www.breastcancer.org/es/sintomas/cancer_de_mama/que_es_cancer_mama)
- \*\*Diario EL TELÉGRAFO bajo la siguiente dirección: [http://www.eltelegrafo.com.ec/noticias/sociedad/4/cancer-de-seno-principal-  
causa-de-muerte-de-las-ecuatorianas](http://www.eltelegrafo.com.ec/noticias/sociedad/4/cancer-de-seno-principal-causa-de-muerte-de-las-ecuatorianas)

## Anexos

### **ABREVIATURAS:**

**ATCC** = American Type Culture Collection

**DMEM** = Dulbecco's Modified Eagle Medium

**DMSO** = Dimetilsulfóxido

**DNAMAN** = Software biología molecular y genética

**EDTA** = Ácido etilendiaminotetraacético

**E2** = estradiol

**E3** = estriol

**FBS** = Suero fetal bovino

**MEM** = Medio esencial mínimo

**MCF-7** = Fundación 7 Cáncer Michigan (carcinoma mamario)

**MTT**= Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol

**PCR** = Reacción en cadena de la polimerasa

**RT-PCR**= Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

**RE** = Receptor de estrógenos

**PBS** = Phosphate Buffer Saline

**PVC** = Policloruro de vinilo

**PTFE** = Politetrafluoroetileno

**RT-PCR**= Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

**TEMED** = Tetrametiletilendiamina

**TPX** = Polimetilpenteno

**TRIZOL** = Agente integrador de ácidos nucleicos