

00361

24



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
División de Estudios de Posgrado

"Caracterización de una Línea de Células Epiteliales de Endometrio de Rata: Un Modelo para Estudiar el Papel del Receptor de Estrógenos en la Proliferación Celular"

T E S I S

Que para obtener el grado Académico de MAESTRO EN CIENCIAS (BIOLOGIA)

p r e s e n t a

ARTURO BARRON GONZALEZ

Director de Tesis: Dra. Julieta Ivone Castro Romero

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

1998

259994



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

- A mi Madre, por todo lo que le debo.
- A Elena, por su amor, apoyo y paciencia.
- A mi hija Daniela, mis hermanos Argelia, Lupita, Carlos, José Luis y Jorge por su comprensión y apoyo.
- A todos mis compañeros y amigos del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular del INPer por tratar de entenderme y su trato amable, en especial a Ivone por su amistad, don de gentes y paciencia para conmigo.

Índice	pag.
Resumen	1
1. Introducción.	1
1.1. Hormonas esteroideas: estructura química y metabolismo	1
1.2. Los estrógenos: Definición y estructura.	3
1.3. Sitio de síntesis de estrógenos.	4
1.4. Acciones de los estrógenos.	5
1.4.1. En diferentes órganos blanco.	5
1.4.2. En la fisiología endometrial.	6
1.5. Importancia del RE en procesos patológicos.	7
1.5.1. Cáncer mamario y endometrial.	7
1.5.2. En la endometriosis.	9
1.6 Mecanismos de acción estrogénica	10
1.6.1. Modelos clásico y de cascada.	10
1.6.2. Estructura del RE.	13
1.6.3. Interacción del RE con los antiestrógenos.	16
1.7. Interacción del RE con las vías celulares de señalización.	18
1.7.1. RE y la ruta de la adenilato ciclasa	18
1.7.2. El RE y los protooncogenes nucleares.	19
1.7.3. El RE y los factores de crecimiento.	21
1.8. Modelo propuesto para la acción de los estrógenos.	22
1.9. Utilidad de los cultivos celulares.	24
1.10. Línea celular RENTRO 1.	25
1.11. Sistema de regulación de la expresión genética.	26
2. Objetivo.	28
3. Material y métodos.	29
4. Resultados.	34
5. Discusión y conclusiones.	38
6. Referencias bibliográficas.	43

Índice de figuras.

Fig.	Pag.
1. Núcleo esteroidal.	2
2. Series de las hormonas sexuales.	2
3. Ruta de síntesis de hormonas esteroides.	3
4. Concentraciones de E2 y RE durante el ciclo menstrual.	7
5. Modelo para el mecanismo de acción estrogénica de “dos pasos”.	11
6. Modelo de cascada de Spelsberg.	12
7. Estructura y organización funcional del RE	14
8. Estructura química de los antiestrógenos	17
9. Posibles mecanismos de acción de los estrógenos.	23
10. Construcción del pUHD 15-1 neo	27
11. Construcción del pUHD 10-3	27
12. Curva dosis-respuesta de tetraciclina.	34
13. Regulación de la actividad de CAT por tetraciclina.	35
14. Cinética de crecimiento de líneas celulares.	35
15. Inmunolocalización del RE en las líneas celulares.	36
16. Curvas de saturación por competencia de unión hormona-receptor.	37

Caracterización de una línea de células epiteliales de endometrio de rata: un modelo para estudiar el papel del receptor de estrógenos en la proliferación celular.

Resumen.

Los estrógenos ejercen gran cantidad de acciones en los tejidos de respuesta a estimulación estrogénica. Estas funciones están directamente relacionadas con proliferación y diferenciación celular y están mediadas por una molécula transdutora de la señal hormonal conocida como receptor de estrógenos (RE) que permite la interacción de la hormona con secuencias específicas de DNA denominadas "elementos de respuesta a estrógenos" (ERE) localizados en el promotor de los genes de respuesta a esta hormona y modifica la tasa de transcripción de estos.

De gran interés ha sido la relación encontrada entre estimulación estrogénica y desarrollo y mantenimiento de neoplasias en los tejidos estrogénico-dependientes, existen gran cantidad de estudios enfocados a establecer los mecanismos que subyacen a esta alteración que permite la proliferación celular desordenada y aberrante que es característica de los tumores.

Se han encontrado evidencias controversiales con respecto al verdadero papel del RE como son la activación sin la unión al ligando, interacciones transcripcionales con otras rutas celulares de transducción de señales (factores de crecimiento, adenilato ciclasa y protooncogenes celulares) que no han podido ser

aclaradas hasta el momento.

Por estas razones pensamos que un modelo celular de origen endometrial en el que se pueda regular la expresión del gen que codifica para el RE sería de utilidad en el esclarecimiento de algunas de estas incógnitas.

Para ello usamos la línea celular de epitelio endometrial de rata denominada Rentro 1 que no expresa el gen endógeno del RE y se le transfectó, de manera estable, el gen humano que codifica para la forma silvestre del receptor de estrógenos (HEGO) dentro del sistema de regulación de la expresión genética tetracicilina (tetOff) de Gossen y Bujard que nos permite modular los niveles de expresión del RE. El sistema es dosis-dependiente de tetracicilina y posibilita "prender" y/o "apagar" el gen.

Se obtuvo la línea celular R1'-49E1 que expresa el RE lo cual comprobamos por inmunolocalización y demostramos la capacidad de regulación del sistema por expresión del gen reportero ERE-CAT y por ensayos de unión hormona-receptor (binding) los que demostraron que los niveles de expresión y constantes de disociación son similares a los reportados para el mismo receptor en células de endometrio y mama tanto para el receptor endógeno como para el transfectado establemente..

1. Introducción.

1.1. Hormonas Esteroides: estructura química y metabolismo.

Las hormonas se definen clásicamente como transmisores químicos liberados por células especializadas hacia el torrente sanguíneo hasta llegar a los tejidos "blanco" o de respuesta a estimulación hormonal en donde ejercen sus efectos. Este es el concepto endocrino que tradicionalmente se ha manejado; sin embargo, en la actualidad se sabe que también existe el efecto hormonal parácrino (difusión y efecto hormonal en grupos de células en la vecindad de la célula productora de la hormona) y autócrino (respuesta de una célula a las hormonas que ella misma produce) ¹(Lachelin 1991).

Los esteroides son una subclase de lípidos que comparten una estructura básica compuesta por un esqueleto de 4 anillos fusionados, 3 ciclohexanos (A,B,C) y un

Caracterización de una línea de células epiteliales de endometrio de rata: un modelo para estudiar el papel del receptor de estrógenos en la proliferación celular.

Resumen.

Los estrógenos ejercen gran cantidad de acciones en los tejidos de respuesta a estimulación estrogénica. Estas funciones están directamente relacionadas con proliferación y diferenciación celular y están mediadas por una molécula transdutora de la señal hormonal conocida como receptor de estrógenos (RE) que permite la interacción de la hormona con secuencias específicas de DNA denominadas "elementos de respuesta a estrógenos" (ERE) localizados en el promotor de los genes de respuesta a esta hormona y modifica la tasa de transcripción de estos.

De gran interés ha sido la relación encontrada entre estimulación estrogénica y desarrollo y mantenimiento de neoplasias en los tejidos estrogénico-dependientes, existen gran cantidad de estudios enfocados a establecer los mecanismos que subyacen a esta alteración que permite la proliferación celular desordenada y aberrante que es característica de los tumores.

Se han encontrado evidencias controversiales con respecto al verdadero papel del RE como son la activación sin la unión al ligando, interacciones transcripcionales con otras rutas celulares de transducción de señales (factores de crecimiento, adenilato ciclasa y protooncogenes celulares) que no han podido ser

aclaradas hasta el momento.

Por estas razones pensamos que un modelo celular de origen endometrial en el que se pueda regular la expresión del gen que codifica para el RE sería de utilidad en el esclarecimiento de algunas de estas incógnitas.

Para ello usamos la línea celular de epitelio endometrial de rata denominada Rentro 1 que no expresa el gen endógeno del RE y se le transfectó, de manera estable, el gen humano que codifica para la forma silvestre del receptor de estrógenos (HEGO) dentro del sistema de regulación de la expresión genética tetracicilina (tetOff) de Gossen y Bujard que nos permite modular los niveles de expresión del RE. El sistema es dosis-dependiente de tetracicilina y posibilita "prender" y/o "apagar" el gen.

Se obtuvo la línea celular R1'-49E1 que expresa el RE lo cual comprobamos por inmunolocalización y demostramos la capacidad de regulación del sistema por expresión del gen reportero ERE-CAT y por ensayos de unión hormona-receptor (binding) los que demostraron que los niveles de expresión y constantes de disociación son similares a los reportados para el mismo receptor en células de endometrio y mama tanto para el receptor endógeno como para el transfectado establemente..

1. Introducción.

1.1. Hormonas Esteroides: estructura química y metabolismo.

Las hormonas se definen clásicamente como transmisores químicos liberados por células especializadas hacia el torrente sanguíneo hasta llegar a los tejidos "blanco" o de respuesta a estimulación hormonal en donde ejercen sus efectos. Este es el concepto endocrino que tradicionalmente se ha manejado; sin embargo, en la actualidad se sabe que también existe el efecto hormonal parácrino (difusión y efecto hormonal en grupos de células en la vecindad de la célula productora de la hormona) y autócrino (respuesta de una célula a las hormonas que ella misma produce) ¹(Lachelin 1991).

Los esteroides son una subclase de lípidos que comparten una estructura básica compuesta por un esqueleto de 4 anillos fusionados, 3 ciclohexanos (A,B,C) y un

ciclopentano (D), que se conoce como *Perhidrociclopentanofenantreno* o núcleo esteroidal (**fig. 1**). Los esteroides comprenden una subcategoría de compuestos químicos que incluyen las gomas, la cadena lateral de fitol de las clorofilas, algunos aceites fragantes, las vitaminas A, E, K y el colesterol²(O'Malley 1991).

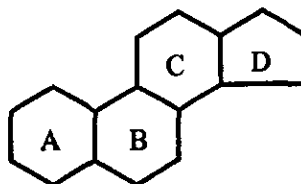


Fig. 1 Núcleo esteroidal o perhidrociclopentanofenantreno

La molécula precursora del colesterol y otros esteroides es el colestano, un núcleo esteroidal de 27 carbonos (27-C) con grupos metilo en el C-10 y C-13 y una cadena lateral de 8 carbonos unidos en C-17. La fisión de la cadena lateral entre el C-20 y 22 lleva a la formación de los esteroides de 21-C o serie de los pregnanos a la cual pertenecen las progestinas. El posterior rompimiento de la cadena lateral entre los C-17 y 20 da como resultado los esteroides de 19-C o serie de los androstanos, a la cual pertenecen los andrógenos; finalmente la remoción del grupo metilo en C-10 lleva a la formación de los esteroides de 18-C conocida como la serie de los estranos, a la cual pertenecen los estrógenos³(Gore-Langton 1994). La esteroidogénesis solo puede transcurrir en ese sentido y no en el sentido inverso (21C-19C-18C)¹ (Lachelin 1991). (**fig. 2**)

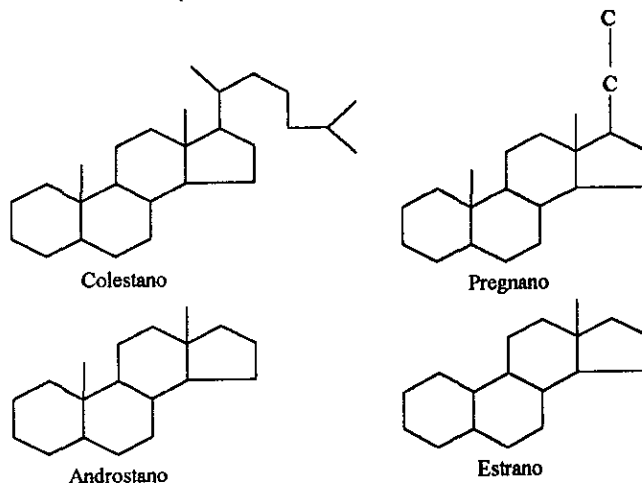


Fig. 2 Series de las hormonas sexuales.

La síntesis de hormonas esteroides implica reacciones de hidroxilación que requieren de nicotin-adenin dinucleotido reducido (NADPH), O₂ activado y la acción del citocromo P-450sc (cortador de la cadena lateral). En la realidad se ha visto que existen dos rutas principales de esteroidogénesis; la de la pregnenolona y la de la progesterona, lo cual implica que, visto de esta manera, esta dos hormonas representan los precursores de todos los

restantes esteroides hormonalmente activos² (O'Malley 1991). (fig. 3)

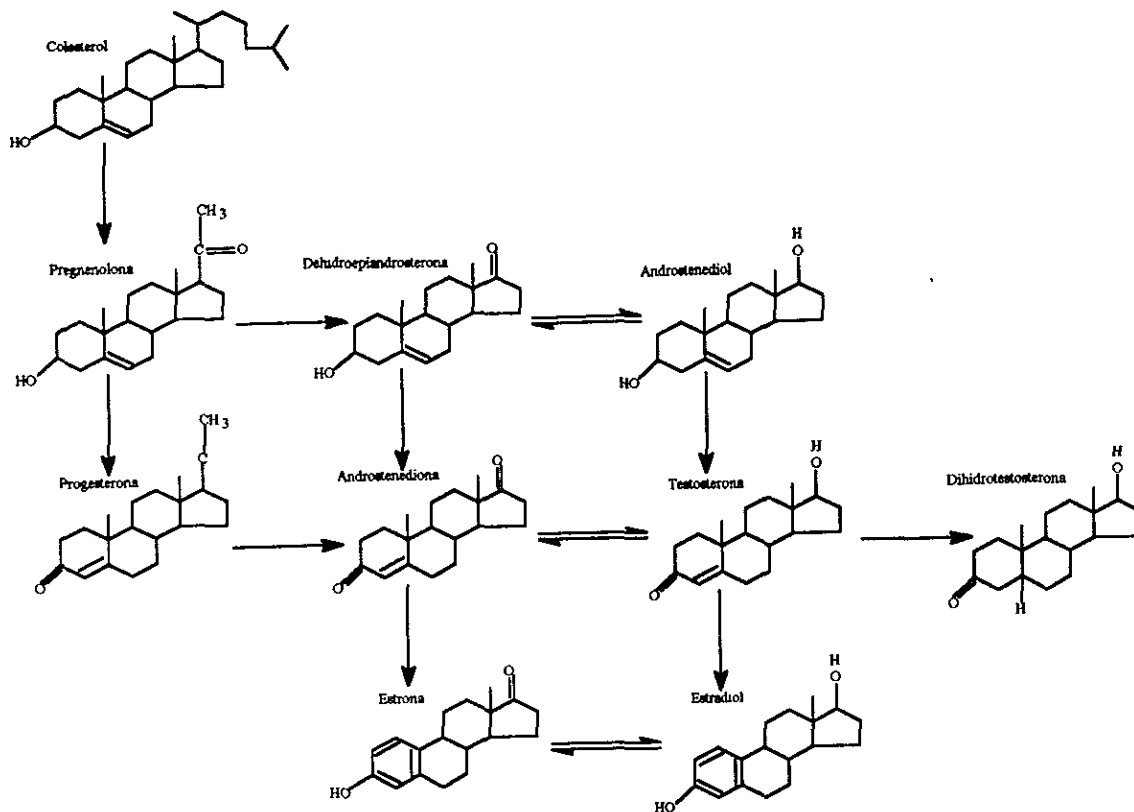


Fig. 3 Rutas de síntesis de las hormonas esteroides.

El tipo de esteroide que es producido y secretado depende del estado fisiológico o fisiopatológico de las células esteroidogénicas y de la actividad de los sistemas enzimáticos involucrados. Los estrógenos son principalmente sintetizados en el ovario por las células de la teca y de del intersticio en conjunto con las células de la granulosa, aunque su síntesis puede ocurrir también en la corteza adrenal pero en mucho menor medida²(O'Malley 1991).

La inactivación de los esteroides ocurre principalmente en el hígado y los metabolitos inactivados son excretados por el riñón. En general la actividad biológica es suprimida por saturación de las uniones dobles y el esteroide es convertido a una forma soluble en agua por conjugación con un ácido, principalmente el glucosidurónico y el sulfúrico⁴(Green 1987).

1.2. Los estrógenos: Definición y estructura.

El término estrógenos es una denominación genérica que incluye las hormonas sexuales femeninas secretadas por los ovarios (durante la gestación también por la placenta) que determinan el desarrollo de las características sexuales secundarias y el inicio de la madurez sexual en las hembras de los mamíferos, además de muchas otras acciones relacionadas con la reproducción. Los más importantes en cuanto a su efecto fisiológico son

el 17 β -estradiol (estra-1,3,5[10]-triene-3,17 β -diol) y la estrona (3-hidroxi-estra-1,3,5[10]-trien-17-ona), el primero es de 10 a 12 veces más potente que el segundo (sobre la base molar) y el más activo de los esteroides producidos por el ovario³(Gore-Langton 1994).

Ambos poseen un anillo A aromático. Su ruta de síntesis ovárica parte de los 4-ene-C19-esteroides, androstenediona y testosterona que son convertidos a estrona y 17 β -estradiol, respectivamente, por un complejo enzimático localizado en la membrana del retículo endoplásmico liso. Este complejo enzimático, conocido como “aromatasa” por la estructura aromática de sus productos, es un citocromo P-450 con funciones mixtas de oxidasa que cataliza una reacción multietapas que conducen a la remoción del grupo metil del C-10, liberado como ácido fórmico, seguida de un rearrreglo del anillo A a una estructura aromática. La reacción requiere de NADPH y O₂ molecular³ (Gore-Langton 1994).

1.3. Sitio de síntesis de los estrógenos

En todas las especies de mamíferos las principales estirpes celulares involucradas en la esteroidogénesis ovárica son de dos tipos básicos; a) las células secretoras de respuesta a hormona luteotrófica (LH) que incluye las de la teca interna y las intersticiales del estroma ovárico y b) las células de respuesta a hormona estimulante del folículo (FSH) que corresponden exclusivamente a las de la granulosa (aunque estas adquieren la capacidad de responder a LH con la maduración folicular). Estos dos tipos celulares difieren en cuanto su origen embriológico y función en los procesos de producción de hormonas esteroides³(Gore-Langton 1994).

La síntesis final de los estrógenos se lleva a cabo de manera conjunta entre ambos tipos celulares; aunque con ligeras diferencias entre las diversas especies de mamíferos, se acepta que las células de la teca e intersticiales producen principalmente, a partir de colesterol, los esteroides de 19-C del tipo de los andrógenos como androstenediona o androsterona, pero su capacidad de aromatasa, si es que existe, es muy limitada, y la función principal de las células de la granulosa, dentro de este proceso de esteroidogénesis, es la conversión de estos andrógenos a compuestos de 18-C como los estrógenos.^{2,3} (O'Malley 1991,Gore-Langton 1994).

La base funcional de la cooperación en la biosíntesis de estrógenos transcurre de la siguiente manera; las células de la teca son estimuladas por la LH para producir andrógenos aromatizables los cuales son secretados y atraviesan la membrana basal para llegar a las células de la granulosa, las cuales responden a la estimulación con FSH incrementando su actividad de aromatasa sin producción propia de sustratos aromatizables para, finalmente, sintetizar estrógenos. De hecho las evidencias experimentales que llevaron a esta conclusión también llevaron a la formulación de la teoría conocida como “dos tipos celulares- dos gonadotropinas” que implica el importante papel de ambos tipos de células dentro de los procesos de regulación de la esteroidogénesis.^{2,3} (O'Malley 1991,Gore-Langton 1994).

1.4. Acciones de los estrógenos.

1.4.1. En diferentes órganos blanco.

La acción de los esteroides sexuales contribuyen, en diversos niveles, al éxito de los procesos reproductivos, actúan sobre los centros del sistema nervioso central que controlan el comportamiento sexual y permiten el coito en el momento que los ovocitos maduros son liberados de los folículos. También ejercen su efecto sobre la musculatura y cilios del oviducto para que el ovocito sea capturado por las fimbrias y retenido en el sitio donde se realiza la fertilización. Asimismo favorecen el transporte de los espermatozoides a este sitio y el momento adecuado de entrada del huevo fecundado en el útero. Por último, determinan los cambios endometriales que deben ocurrir para la implantación, el desarrollo del embrión, el mantenimiento de la gestación y finalmente el parto³(Gore-Langton 1994).

En general se puede decir que están involucrados con procesos de crecimiento, proliferación y diferenciación celular de los tejidos relacionados con los aspectos reproductivos en los mamíferos. En las hembras de los mamíferos, antes de la madurez sexual, los estrógenos son secretados en concentraciones sumamente reducidas, pero al llegar a la pubertad su secreción aumenta considerablemente por la influencia de las gonadotropinas (LH y FSH).

Es en este momento que inducen las modificaciones que conducen al desarrollo de los caracteres sexuales secundarios y los cambios en la anatomía e histología del tracto reproductor; el epitelio vaginal pasa de cúbico a estratificado, la vagina aumenta de volumen, algo similar ocurre con el epitelio de los oviductos en el que además induce el aumento de células glandulares y ciliadas. En la glándula mamaria producen aumento del estroma, desarrollo del sistema de conductos y depósito de grasa, en útero propician el aumento de volumen pero lo más importante es el efecto que presentan sobre el tejido de revestimiento del útero; el endometrio en donde produce los cambios asociados al ciclo endometrial que conllevan variaciones dramáticas en la proliferación de las células endometriales que son características de los ciclos estrales en las hembras de mamíferos no primates y de los ciclos menstruales en los primates⁵(Guyton 1992).

Es decir que los E₂ influyen el crecimiento, diferenciación y fisiología de muchos tejidos conocidos como de “respuesta estrogénica”; como útero⁶(Strauss 1991), oviducto⁷(Lau 1990), la glándula mamaria⁸(Going 1988), hipotálamo⁹(Sar 1986) e hipófisis¹⁰(Friend 1995).

Asimismo en tejido óseo estos esteroides ejercen un papel importante en el mantenimiento del tejido y se ha demostrado su importancia en la fisiología de otros tejidos como el hígado^{1,11}(Lachelin 1991,Ciocca 1995) así como también, el hecho de gran importancia clínica de su participación en la aparición y mantenimiento de algunos tumores derivados de mama^{12,13,14}(Van de Vijver 1991, Fuqua 1991, 1992), útero^{15,16,17,18}(Bergvist 1993, Howell 1994, Kohler 1995, Ma 1994,), prostata¹⁹(Konishi 1993) y en líneas celulares derivadas de estos tejidos^{20,21,22,23}(Ferguson 1995, García 1992, Phillips

1993, van Agthoven 1993), así como de ovario²⁴(Clinton 1996).

1.4.2. En la fisiología endometrial.

El endometrio es el tejido que reviste la cavidad uterina y que se relaciona de forma muy importante con los procesos de implantación y desarrollo del embrión en las hembras de los mamíferos, principalmente los placentados verdaderos (Eutheria). Presenta ciclos periódicos que son una representación tisular de los ciclos reproductivos que sigue el organismo como un todo.

Uno de los efectos mas notables de los estrógenos a nivel proliferativo y de diferenciación celular se puede observar en el ciclo endometrial de las hembras de los mamíferos placentados, que aunque con algunas diferencias es básicamente el mismo entre los primates y los demas mamíferos. Los primeros presentan ciclos endometriales periódicos menstruales con sangrado final, si no existe fecundación, como en el caso de las hembras de los humanos, en el cual se pueden distinguir 5 fases o etapas claramente definidas; en un ciclo "normal" de 28x5 días; el ciclo inicia en el primer día del sangrado o "menstruacion" (día 1) y continua hasta el día 5, del día 6-9 se considera la fase proliferativa temprana, del 9-14 la proliferativa tardía, con la ovulación en el día 14, posteriormente del día 15 al 21 se define la fase secretora temprana y del 21-28 la fase secretora tardía y con ella el fin de este ciclo y el inicio de otro. Las fases proliferativas son determinadas principalmente por estimulación estrogénica y corresponden a la fase folicular del ciclo ovárico, con un pico de LH antes de la ovulación (que corresponde al pico de estradiol en esa misma etapa), y en las fases secretoras predomina el estímulo progestacional y corresponden a la fase lutea del ciclo ovárico.^{6,25,26} (Strauss 1991, Lessey 1988, Brenner 1994).

Obviamente que este ciclo se ve alterado si existe fecundación, ya que esto lleva hacia la decidualización del endometrio y los cambios asociados con la gestación.

En las hembras de mamíferos no primates existe un ciclo denominado "estral", uno de los más conocidos es el de la rata que corresponde normalmente a un ciclo de 4 días, que se divide en las siguientes fases: proestro, estro, metestro, diestro; siendo en el estro cuando presenta la ovulación. En este esquema no existe hemorragia transvaginal, pero en general se sabe que los acontecimientos endócrinos y celulares que ocurren durante el ciclo estral son en esencia los mismos que los del ciclo menstrual²⁷(Ganong 1988). El proestro es el periodo en el que el tracto genital de la hembra esta preparandose para la fecundación y corresponde a la fase proliferativa del ciclo menstrual, es seguido por el estro durante el cual se produce la ovulación y la cópula. Continúa un periodo llamado metestro durante el cual los cambios en el tracto reproductor son más lentos l cual sigue el diestro en el cual las hormonas ováricas preparan al tracto reproductor para recibir el huevo fecundado , estos periodos corresponden con la fase secretora del ciclo endometrial en animales con ciclo menstrual²⁸(Freeman 1994).

La expresión del RE durante el ciclo menstrual corresponde de manera coordinada con los niveles de estrógenos plasmáticos durante el ciclo con un pico en el día 13, justo

antes de la ovulación y cuando los niveles de E2 están disminuyendo. (fig. 4)

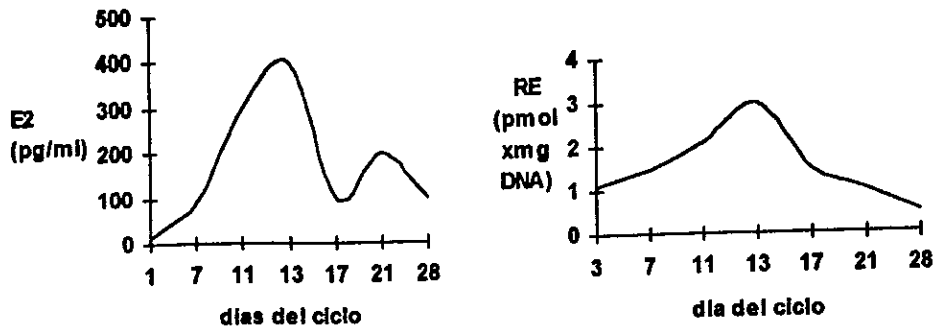


Fig. 4 Concentraciones de E2 y RE durante el ciclo menstrual. (Tomado de Straus, 1991⁶).

Todos los cambios inducidos por los E2 se inician con la unión de la hormona a su receptor y su posterior interacción con los genes que en su región promotora presenten elementos de respuesta a estrógenos (ERE) y la consecuente modificación de sus tasas de transcripción. La estimulación estrogénica induce la síntesis de somatomedinas como el factor de crecimiento similar a insulina 1 (IGF-1), factor de crecimiento transformante α y β (TGF α y β), factor de crecimiento epidermal (EGF) así como de su receptor (EGFr), también incrementa la expresión de protooncogenes como myc, fos, jun involucrados en la regulación de la expresión genética y la síntesis de DNA en útero⁶(Strauss 1991).

Los genes que codifican para los receptores hormonales están, asimismo, bajo control hormonal, por ejemplo la estimulación con E2 induce la síntesis del RE y promueve la síntesis del receptor a progesterona (RP) que a su vez al unirse a la hormona regula el efecto estrogénico inhibiendo la síntesis del RE, pero también efectuando una retroalimentación negativa sobre la síntesis de su propio receptor. Estos mecanismos tienen como finalidad proteger a la células de una excesiva estimulación hormonal que pudiera ser dañina²(O'Malley 1991).

1.5. Importancia del RE en procesos patológicos.

1.5.1. Cáncer mamario y endometrial.

Una de las razones por la que se intensificó en las dos últimas décadas la investigación en el campo de los mecanismos de la acción estrogénica y el papel del RE en proliferación celular se debe a la relación existente entre estimulación estrogénica y la aparición y mantenimiento de neoplasias tanto benignas como malignas (cáncer), sobre todo de mama y endometrio, así como con otras patologías como la endometriosis.

Un hecho incontrovertible en cuanto a la relación entre neoplasias y estimulación estrogénica se encuentra en el caso del cáncer de mama. Aunque el origen del crecimiento neoplásico es un fenómeno multifactorial y multietapas, en los últimas décadas se ha visto

que uno de estos factores de riesgo mas importantes es la estimulación hormonal, siendo la estimulación estrogénica considerada como una de las posibles fuentes originales de la transformación neoplásica. Esta situación parece mas obvia en el caso de la mama en la que se ha establecido claramente que la exposición prolongada es un factor de riesgo importante. De hecho uno de los eventos clínicos de mayor importancia tanto en el diagnóstico como el pronóstico y estrategias de tratamiento en la pacientes de este tipo de cáncer es la determinación de la dependencia hormonal del tumor, esto es, la presencia de los receptores hormonales, principalmente receptor de estrógenos (RE) y receptor de progesterona (RP)^{29,30,31,32} **(Henderson 1982, Henderson 1988, Marchand 1994, Thomas 1984).**

La presencia de estos receptores en las células cancerosas de tejido mamario predicen un bajo riesgo de recurrencia, una mayor y mejor sobrevida y permite identificar tumores que responden a la terapia hormonal. Sin embargo el 50% de los tumores RE+ que originalmente responden a terapia hormonal con antiestrógenos, progresan a un estado de independencia hormonal y los mecanismos que operan en este fenómeno son totalmente desconocidos²³ **(van Agthoven 1993).**

Por otro lado, en relación al carcinoma endometrial, se sabe que es el más común de los cánceres ginecológicos con aproximadamente 33,000 nuevos casos en EEUU por año. A pesar de que las bases moleculares de su origen se desconocen se asume, de manera generalizada, que la exposición del útero a dosis elevadas de E₂ es el principal factor de riesgo para el desarrollo de esta neoplasia.

La relación entre los estrógenos y cáncer endometrial es compleja y poco clara, pero el desarrollo de hiperplasias endometriales dosis-dependientes de E₂ ha sido bien documentada. Por ejemplo, un porcentaje significativo de mujeres con tumores de células de la teca y granulosa son diagnosticadas con hiperplasia adenomatosa y 9% con carcinoma endometrial. Igualmente ocurre en las mujeres anovulatorias con síndrome de ovario poliquístico debido a que el endometrio está crónicamente expuesto a los E₂. **Peterson** y sus colaboradores estimaron que la terapia cíclica con estrógenos incrementa el riesgo de cáncer endometrial de 1x1000 a 4x1000/año³³.

La mayoría de los cánceres endometriales (60-70 %) expresan el RE³⁴ **(Assiskis 1996)** y aunque existen pocos reportes sobre la significancia clínica de este evento en endometriomas, la presencia del RE correlaciona de manera adecuada, tal y como ocurre en el cáncer de mama, con factores pronósticos favorables como fenotipo poco agresivo y ausencia de invasión miometrial³⁵ **(Kaupilla 1988).**

En un estudio realizado en 56 casos de carcinoma endometrial en la búsqueda de mutaciones del gen del RE, bajo el principio de que en cáncer de mama se han documentado una cantidad importante de mutaciones asociadas al desarrollo neoplásico, se encontró un bajo porcentaje (10 %) de mutaciones, de tal modo que no es posible correlacionar las mutaciones del gen del RE con la aparición de los endometriomas¹⁷ **(Kholer 1995).** También Assiskis encontró resultados muy similares a estos cuando analizó por polimorfismos de restricción las mutaciones asociadas a carcinoma de endometrio (8.5 %), por lo que sus

conclusiones son similares a las del reporte anterior³⁴(Assiskis 1996).

De capital interés han sido algunos estudios que demostraron que la reexpresión del RE en líneas celulares de cáncer de mama que no expresan el RE (RE-) coinciden con una disminución de la proliferación y capacidad invasiva de las células tumorales²¹(García 1992). Resultados similares se obtuvieron cuando se transfecto de manera estable el gen del RE en células MDA-MB 468 (cáncer de mama) que no expresan el RE³⁶(Wang 1997).

El significado de este tipo de hallazgos aun permanece por ser establecido pero sin embargo el potencial que representan, sobre todo con intención terapéutica podría ser de suma importancia.

1.5.2. En la endometriosis.

La endometriosis es una enfermedad que se presenta durante la vida reproductiva de la mujeres y que consiste básicamente en la implantación y proliferación de tejido endometrial fuera de la cavidad uterina, es decir en localización ectópica. Se asocia principalmente con infertilidad, con una incidencia de 20-40 % y en población abierta de 0.1% a 1%. El síntoma característico es la dismenorrea (dolor menstrual), aunque también se puede presentar con sangrados transvaginales fuera de ciclo y dispareunia (dolor durante el coito)^{37,38}(Alvarado 1992, Mahmood 1991).

Los sitios preferenciales de ubicación de los implantes ectópicos se encuentran en la cavidad peritoneal, aunque se han documentado incluso en pulmón y vías aéreas superiores. En muchos casos los implantes endometrióticos pueden estar sincronizados con el endometrio eutópico e incluso presentar el sangrado menstrual característico, pero en otros casos no se observa este fenómeno y el tejido endometriótico se comporta de manera autónoma^{37,39,40}(Alvarado 1992, Olive 1993, Rock 1992).

El tratamiento mas común es el uso de Danazol (17-pregna-2-4-dien-20-inol[3,3-D] isoxazol-17-ol) por periodos prolongados (6-12 meses) el cual suprime la secreción de LH y FSH, inhibiendo, por lo tanto, la esteroidogénesis gonadal. El tratamiento es relativamente exitoso sobre todo en la supresión de los síntomas, pero con respecto a la infertilidad no existen elementos decisivos para hacer afirmaciones al respecto. Desafortunadamente en cuanto se suspende el tratamiento se restablece la proliferación de los focos endometrióticos y los síntomas. En general presenta una recurrencia del 40 % y parece obvia la dependencia de la estimulación estrogénica^{37,39,40}(Alvarado 1992, , Olive 1993, Rock 1992).

Desde inicios de los 80's Bergvist y sus colaboradores han estudiado la relación entre la expresión del RE y el mantenimiento de los focos endometrióticos y han encontrado que la expresión del RE es diferente en el endometrio ectópico comparado con el eutópico y concluyen que los niveles de expresión en el tejido endometriótico son menores que en el tejido normal y en algunos casos no es posible detectar el receptor^{15,41,42}(Bergvist 1993,1981, 1984).

Otros estudios han obtenidos resultados similares pero agregando que no solo se puede hablar de niveles menores sino heterogéneos de expresión del RE dependiendo de si se trata de una lesión primaria o recurrente, y del sitio de localización del foco endometriótico^{25,43,44,45} (Lessey 1988, 1989, Higuchi 1995, Prentice 1992). En el caso de la endometriosis, como en el de cáncer de mama y endometrio la proliferación de los tumores puede progresar a la independencia hormonal o resistencia al tratamiento y aunque se sabe que el RE tiene un papel importante en estos procesos se desconoce cuál es.

1.6. Mecanismos de acción estrogénica.

1.6.1. Modelos clásico y de cascada.

Históricamente la investigación sobre los mecanismos de acción de la estimulación estrogénica se inició de la década de los 60's cuando se identificaron algunas proteínas intracelulares con capacidad de unirse a esteroides sexuales con alta afinidad y especificidad⁴⁶ (Jensen 1962); pocos años después dos grupos de investigación propusieron, en forma independiente, el primer modelo de acción estrogénica que suponía la existencia de receptores celulares específicos que al unirse con la hormona iniciaban una serie de eventos que finalmente conducían a una modificación de la expresión genética de las células de respuesta a la hormona^{47,48} (Gorski 1968, Jensen 1968). Posteriormente la investigación en este campo se vio incrementada debido a la relación que se encontró entre cierto tipo de cánceres femeninos y las hormonas sexuales.

El modelo que se acepta actualmente no difiere mucho del originalmente propuesto, conocido como "de dos pasos" en el que se asume que los estrógenos libres difunden pasivamente hacia el interior de la célula, una vez dentro son retenidos por la formación de un complejo con proteínas intracelulares específicas del tejido y para el esteroide⁴⁹ (Katzenellenbogen 1980), conocidas como RE, que se encuentran en una concentración promedio de entre 10,000 a 100,000 moléculas por célula. Cada receptor se une a su ligando con una alta afinidad, con constantes de disociación entre 10^{-8} - 10^{-10} M. Esta unión significa la "activación" del receptor, lo que implica cambios conformacionales en el receptor que le permiten unirse a sitios específicos en DNA y de actuar como un activador o modulador transcripcional⁵⁰ (Landers 1992).

La característica principal de este modelo es que el mecanismo de acción de la estimulación estrogénica implica dos pasos : 1) la activación del receptor por unión con la hormona y 2) la unión al DNA que induce la transcripción de un gene estructural, que sirve como plantilla para la síntesis de una proteína que, eventualmente, modifica la actividad celular.(fig. 5)

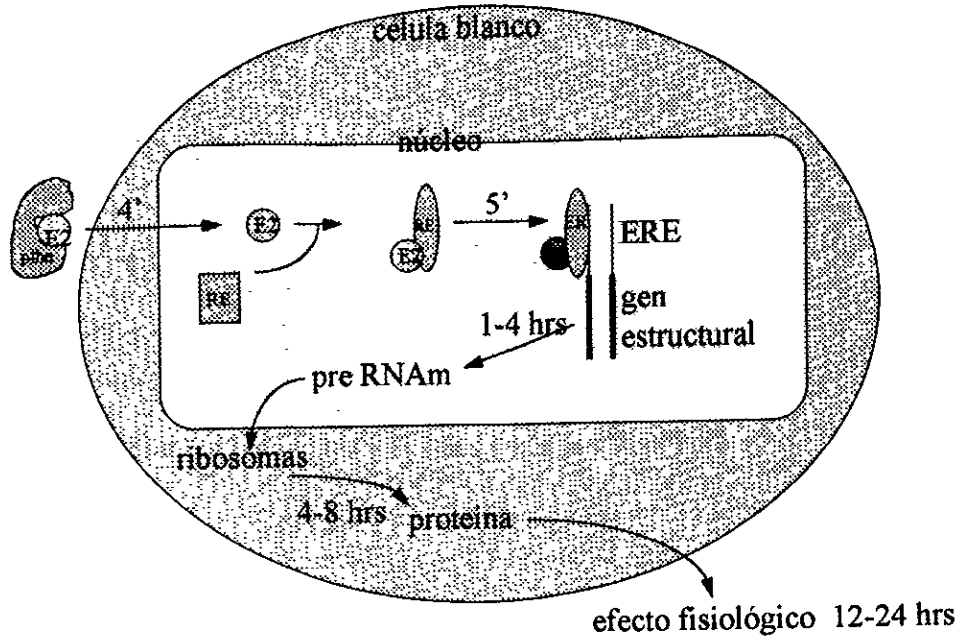


Fig. 5 Modelo propuesto para el mecanismo de acción estrogénica de “dos pasos”. plhe (proteína ligadora de hormonas esteroides), E2 (17β-estradiol), RE (receptor de estrógenos), ERE (elemento de respuesta a estrógenos) [modificado de Landers 1992⁵⁰ y Schuchard 1993⁵¹]

Más recientemente el grupo de Spelsberg ⁵⁰(Landers 1992) propuso un modelo que incluye la posibilidad de que la acción de los estrógenos se lleve a cabo ejerciendo su efecto transcripcional inmediato sobre genes de respuesta temprana que codifican para proteínas reguladoras, como los protooncogenes myc, fos y jun, los que actúan como estaciones de relevo para la acción hormonal y que a su vez activan transcripcionalmente a otros genes estructurales que serían los responsables del cambio fenotípico en las células. **(fig. 6)**

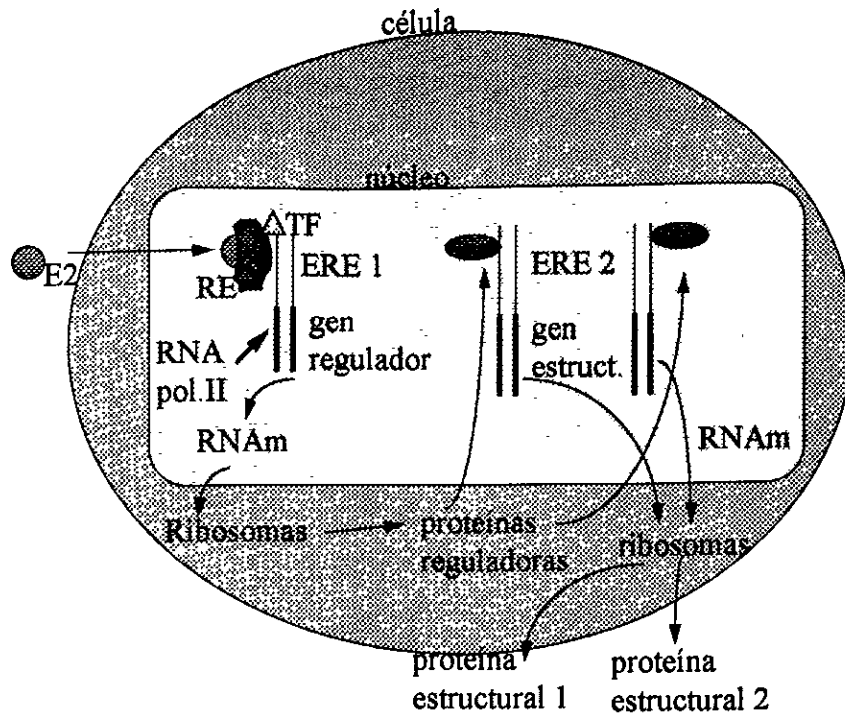


Fig. 6 Modelo de cascada propuesto por Spelsberg para el mecanismo de acción de las hormonas esteroideas. TF=factores de transcripción. (Landers 1992⁵⁰)

La estructura de los elementos de respuesta a esteroideas son notables por su similitud, sus secuencias varían solo ligeramente, como ya se había mencionado anteriormente, lo cual nos habla de una especificidad elevada, por ejemplo el elemento de respuesta a estrógenos (ERE) tiene la secuencia GGTCANNNTGACC (donde N puede ser cualquier base) y solo difiere ligeramente del elemento de respuesta a hormona Tiroidea (presenta solo una base de secuencia intermedia).

En base a las nuevas evidencias de la investigación en este campo, es claro que aún está es una visión simplificada de los eventos biológicos que dirigen, controlan y regulan la expresión genética de una células y que, en el caso de los tejidos de respuesta estrogénica, tienden principalmente hacia procesos de crecimiento, proliferación y diferenciación, y en algunos casos hacia la transformación neoplásica.

Esta situación llevo a muchos grupos científicos la búsqueda de nuevos conocimientos para entender los mecanismos y las vías involucradas en la acción de los esteroideas. A la fecha existen múltiples estudios cuyos hallazgos involucran básicamente tres rutas de regulación y señalización celular; la de adenilato ciclasa (AMPc), la de los protooncogenes nucleares, principalmente fos, myc y jun, y la de los factores de crecimiento particularmente el EGF y el IGF-I. A continuación se muestra una breve revisión de la importancia de cada una de estas rutas.

1.6.2. Estructura del receptor de estrógenos (RE):

Todas las acciones que los estrógenos ejercen a nivel transcripcional y que han sido comentadas en los capítulos anteriores, están mediadas por una molécula que se conoce como el receptor de estrógenos (RE) que es una proteína nuclear, de aproximadamente 66 KiloDaltones (KDa) de peso molecular, altamente fosforilada, que funciona como una molécula transductora de la señal hormonal y actúa como factor de transcripción, con capacidad de unión a secuencias específicas del DNA en el genoma, y regula, en determinados momentos la cantidad de transcritos de RNA mensajero (RNAm)^{52,53} (Parker 1993, 1995). Es de localización nuclear y ha sido demostrada por inmunomicroscopía electrónica su presencia en varios tipos celulares de tejidos de rata como; epiteliales de endometrio, cuerpo luteo, hepatocitos, epiteliales de duodeno, músculo estriado, células de tubo contorneado proximal de riñón, linfocitos, neuronas y adipocitos⁵⁴ (Echeverría 1994).

El gen que codifica para el RE fue clonado y secuenciado a partir de células MCF7 (cáncer de mama humano) por dos grupos, en forma independiente, y ambos coinciden en que el cDNA de 1785 pares de bases (pb) codifica para una proteína de 595 aminoácidos (aa) y 62.5 KDa de peso molecular.^{55,56} (Greene 1986, Green 1986). Posteriormente se estableció que la secuencia presentaba un artefacto de clonación; el cambio de una valina por una glicina en la posición 400, esta forma mutada se conoce como HEO o VAL 400 para diferenciarla del gene silvestre humano que se denomina HEGO⁵⁷ (Levenson 1994).

Este receptor pertenece a una gran familia de receptores, entre los cuales se encuentran los específicos para progesterona (RP), glucocorticoides (RG), hormonas tiroideas (RT), Vitamina D (VD), retinol (RaR), así como los conocidos como “receptores huérfanos”, con los cuales mantiene una alta homología en algunos de sus dominios⁵⁸ (Evans 1988).

Cada uno de los integrantes de esta familia tiene en su estructura tres dominios importantes para su función biológica: una secuencia específica en la región C-terminal, en donde se une el ligando y contiene además dos funciones de activación (TAF-2 y TAF-2a); una región para su unión a sitios específicos dentro del genoma (DNA) y por último, el dominio amino terminal, el cual tiene la función de activación de la transcripción (TAF-1). Aparte de estos tres sitios, existen otros más, que si no son del todo necesarios para la transcripción, una alteración en su secuencia de aminoácidos modifica la respuesta generada por el complejo ligando-receptor.^{53,57} (Parker 1995, Levenson 1994).

El RE como todos los otros receptores hormonales de esta familia, está codificado por un gen único que contiene 8 exones y se divide en seis regiones, A-F. Así, el exón 1 codifica para el dominio N-Terminal (A/B), los exones 2-3, el dominio de unión al DNA (C); el exón 4 para el conocido como dominio “hinge” (bisagra) (D); y los exones 5-8 codifican para la región de unión del receptor al esteroide (E-F) (fig. 7). Para que un receptor cumpla con su función debe llevar a cabo varias etapas: translocación al núcleo,

unión al ligando, dimerización del receptor, unión al DNA y activación de la transcripción. Todas estas funciones se llevan a cabo por la presencia de sitios específicos dentro de la secuencia de aminoácidos que conforman ésta proteína⁵⁹(Krust 1986).

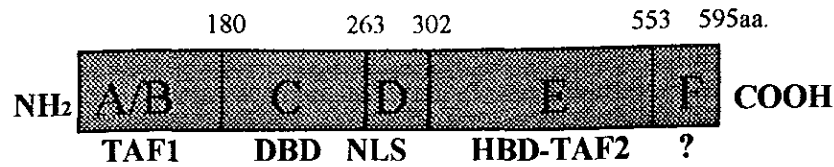


Fig. 7 Estructura y organización funcional del RE. el dominio A/B contiene la función de activación de la transcripción 1 (TAF 1) que es independiente de la unión del ligando, el dominio C la región de unión a DNA (DBD), entre la región C y D se encuentra la señal de localización nuclear (NLS), el dominio E contiene las regiones de unión a la hormona (HBD) y la de activación de la transcripción 2 (TAF 2) dependiente de la unión con la hormona, finalmente el dominio F no tiene una función claramente establecida pero las evidencias experimentales indica que podría ser el dominio de regulación de la actividad transcripcional y eventualmente, una zona de determinación de la tejido especificidad.^{53,57} (Parker 1995, Levenson 1994).

El dominio de unión a DNA (DBD) es del tipo de los “dedos de zinc”; tiene 9 residuos de cisteína los cuales están formando dos de estos complejos, cada uno de los cuales tiene un ion de este elemento unido a 4 residuos de cisteína para formar la estructura proteica que más comúnmente interactúa con secuencias de DNA.²(O’Malley 1991)

El RE se encuentra localizado principalmente en el núcleo, independientemente si está o no unido a su ligando, sin embargo, existen algunas evidencias que señalan que a pesar de que también se encuentra difundido en el citoplasma, éste se transporta rápidamente al núcleo por un mecanismo dependiente de energía ^{60,61}(Guichon-Mantel 1991, Dauvois 1993). Vázquez-Nin y colaboradores demostraron a nivel ultraestructural la localización del RE en el núcleo de la células uterinas de rata (endometrio, miometrio y fibroblastos uterinos) en donde se encuentra asociado a partículas de ribonucleoproteínas heterogéneas nucleares. También demostraron un efecto postranscripcional de los E₂ en el cual la ovariectomía induce la retención de RNAm en el núcleo de estas células y el consecuente aumento de granulos pericromatinianos, los cuales son rápidamente transportados hacia el citoplasma después de la administración del estradiol, antes de que este pueda ejercer un efecto a nivel transcripcional⁶²(Vázquez-Nin 1991).

La región principal de señalización para la localización del receptor a nivel del núcleo está formada por tres regiones básicas que se encuentran cercanas al extremo C-terminal del dominio de unión al DNA, las cuales están expuestas aún en ausencia del estradiol ^{63,64}(Picard 1990, Ylikomi 1992).

Desde hace varios años se acepta que el RE sin ligando se encuentra formando un complejo oligomérico en el cual se pueden encontrar algunas otras proteínas unidas, como la hsp90 (proteínas de choque térmico)^{65,66}(Catelli 1985, Redeuilh 1987) u otras proteínas

como la hsp70, p59,p54,p50,p23, pero no se ha determinado si éstas se encuentran directamente unidas al receptor ó lo hacen a través de la propia hsp90⁶⁷(Pratt 1993).

La presencia de la hsp90 mantiene al receptor inactivo en ausencia del ligando y es importante para el enrollamiento de la proteína y el transporte del receptor a través de la membrana ⁶⁸(Smith 1993). Chambraud⁶⁹ y Schlatter⁷⁰ demostraron que el sitio de unión de la hsp90 se localiza en el dominio de unión del receptor a la hormona, situado en la región C-terminal del receptor y que está constituido por 250 aminoácidos (aa). Este sitio ha sido bien caracterizado por diferentes investigadores^{71,72,73} (Katzenellenbogen 1987, Kumar 1986, Fawell 1989) y se sabe que los aminoácidos que se encuentran en la región entre 518-525 son necesarios para la unión del estrógeno a su receptor.⁷⁴(Danielian 1993).

El complejo activado RE-E₂ se une en forma de homodímero a secuencias específicas de DNA conocidas como ERE, las cuales han sido identificadas como un palíndromo invertido de 13 pares de bases. Este fue originalmente identificado en la región promotora del gen de vitelogenina A2 de *Xenopus laevis* y corresponde a la secuencia GGTCACAGTGACC y anteriormente ya se había identificado la presencia de este palíndromo en las secuencias de flaqueo 5' de varios genes regulados por estrógenos⁷⁵(Klein-Hitpass 1988). Las investigaciones posteriores determinaron que la parte importante de la secuencia de este palíndromo son las 5 bases de los extremos, quedando establecida la secuencia como sigue: GGTCANNNTGACC, en donde N puede ser cualquier base, y aunque quizá no sea importante el tipo de base de que se trate, se sabe que sí es importante su presencia física por que se ha determinado que el receptor a hormona tiroidea reconoce la misma secuencia externa pero solo hay una base interna, es decir, N=1 y la secuencia es un palíndromo invertido de 11 bases²(O'Malley 1991).

En contradicción a los datos anteriormente referidos, Gorski⁷⁶ en 1993 basándose en resultados propios y de otros investigadores, propone que el RE se une al DNA en forma monomérica, sin necesidad de unirse con el ligando, pero sí en asociación con otras proteínas para formar un complejo heterodimérico con capacidad de unión al DNA. Esto posibilitaría que las proteínas que se estarían uniendo al receptor de estrógenos sean diversas, lo que daría mayor libertad en la regulación de la amplia variedad de ERE's presentes en el genoma y, probablemente, la tejido-especificidad.

Desde esta perspectiva la unión del receptor con la hormona no tendría efecto en la unión al DNA, pero sí posibilita los cambios conformacionales que permiten al receptor interactuar con otras proteínas y/o factores de transcripción e incluso con otras proteínas de cromatina asociadas a esos genes, lo cual constituiría verdaderamente el disparo de la actividad transcripcional del receptor. Esto implica que en las células intactas el receptor de estrógenos se comporta como si estuviera inmovilizado, probablemente unido a DNA ó a proteínas de la cromatina en la cercanía de los genes que regula transcripcionalmente. Por lo tanto, la unión a estrógenos no tendría influencia en la unión del receptor al DNA, pero si induciría cambios dramáticos en su estructura, siendo el más importante la reducción en hidrofobicidad superficial del receptor; es decir, la internalización de la cadena lateral de aminoácidos hidrofóbicos en el extremo COOH terminal, sitio en donde se ubica el dominio

de unión al ligando⁷⁶(Gorski 1993).

De hecho, con anterioridad ya se especulaba con la posibilidad de que los receptores hormonales en general y el RE en particular pudieran ser activos transcripcionalmente aún sin unirse con el ligando, sugiriendo que la unión con la hormona simplemente aumenta su actividad. Esto llevaría a un concepto nuevo sobre la acción de las hormonas esteroideas en el cual las hormonas no inician nuevos eventos, en cambio regulan o modulan los procesos que ya están en operación⁷⁷(Clark 1994). Desafortunadamente en la actualidad aun no se cuenta con el conocimiento suficiente que permita concluir de forma determinante sobre este tema.

Por otro lado y como se señaló en los párrafos iniciales, el RE es una proteína altamente fosforilada y un gran número de autores coinciden con el hecho de que dicha fosforilación (*in vivo*) ocurre en los residuos de serina^{78,79,80,81} (Denton 1992, Lahooti 1994, LeGoff 1994, Washburn 1991) mostrando a su vez evidencias de que dicha condición es importante para su función, sin embargo para compuestos con actividad antiestrogénica, como los ICI o el tamoxifen, se ha demostrado que incrementan la fosforilación del receptor en sitios específicos sin activar la transcripción.

En relación a lo primero se tiene el hecho de que a pesar de que la proteína se encuentra fosforilada, la presencia de la hormona genera un gran incremento en los niveles de fosforilación^{82,83}(Orti 1992, Kiuper 1994); por otro lado, se ha visto que algunos factores que actúan en forma independiente a los esteroideos (vg. factor de crecimiento epidermal [EGF], factor de crecimiento similar a la insulina [IGF-1]) son capaces de inducir la fosforilación y activación del RE a través de señales que generan una cascada de eventos de fosforilación⁸⁴(Tsai 1994). Por último se sabe que la fosforilación del receptor tiene influencia sobre los mecanismos de unión del ligando, de unión al DNA, en la activación de la transcripción y el reciclamiento de los receptores⁸³(Kiuper 1994).

1.6.3. Interacción del RE con los antiestrógenos.

Los antiestrógenos son compuestos que antagonizan los efectos que la estimulación estrogénica tiene sobre los tejidos de respuesta a esta hormona por lo que se les ha dado gran importancia para uso terapéutico (fig. 8). Su efecto inhibitorio lo llevan a cabo por competencia con la hormona natural por el RE, alterando su conformación lo cual impide que ejerza su efecto transcripcional^{85,86}(Katzenellenbogen 1985, Jordan 1990).

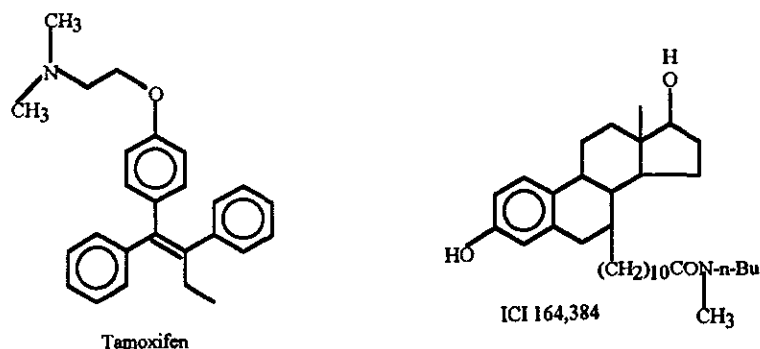


Fig. 8 Estructura química de los antiestrógenos de mayor uso en ensayos experimentales. El tamoxifen es un antiestrógeno de tipo parcial y de amplio uso en la terapia médica, el ICI 164,384 es un antagonista puro.

Los estudios del grupo de Katzenellenbogen de los últimos 5 años han llevado a la conclusión de que la respuesta génica a los E2 y antiestrógenos depende de 4 factores: 1) la naturaleza del RE, es decir si se trata de la forma silvestre o alguna variante, 2) el tipo de promotor que presenta el gen, 3) el contexto celular y 4) el ligando. Pero también concluyen que la respuesta genética puede ser modulada por AMPc, factores de crecimiento y sustancias que afectan la actividad de protein-cinasas y de fosforilación celular⁸⁷ (**Katzenellenbogen 1995**).

Los modelos de la acción molecular de los antiestrógenos son muy recientes y se ha encontrado que existen dos categorías de antiestrógenos; a) los parciales o agonistas-antagonistas (tipo 1), como el tamoxifen (OHT) y el raloxifen, y b) los puros o totales que presentan, en todas las circunstancias en que han sido probados, un efecto antagonista, un ejemplo de estos es la familia de los ICI (Imperial Chemical Industries), de los cuales el más usado es el número 164,384.^{53,87} (**Parker 1995, Katzenellenbogen 1995**),

Aún cuando no son claros los mecanismos por los cuales ejercen su acción se piensa que los del tipo 1 se unen al RE y el complejo RE-AntiE2 es capaz de unirse como dímero a los ERE bloqueando el efecto activador de la región E del receptor (la región de activación que es dependiente de la hormona), pero tienen poco o ningún efecto sobre la función de activación de la región A/B la cual es independiente del ligando y esto podría explicar sus actividades contrastantes⁵³ (**Parker 1995**).

Los antiestrógenos puros basan su actividad antagonista en que al unirse al RE inhiben la dimerización y, por lo tanto, bloquean la unión al DNA; también parecen bloquear la translocación nuclear del receptor. Asimismo algunos datos sugieren fuertemente que la vía de señalización del AMPc está involucrada en la activación transcripcional del RE por tamoxifen pero no cuando se trata de ICI 164,384, lo cual complica el esquema de los modelos de acción de los antiestrógenos, ya que se acepta que tanto estos como los E2 inducen fosforilaciones en el receptor y que la diferencia radica en la especificidad de los sitios en que se lleva a cabo esta fosforilación^{81,87,88,89} (**Whasburn 1991, Katzenellenbogen 1995, Metzger 1995, Fawell 1990**).

Aproximadamente el 60% de los cánceres de mama expresan el RE y de éstos solo el 60% responden a la terapia con antiestrógenos (básicamente con OHT que es el de uso generalizado), pero los tumores desarrollan resistencia a la terapia dentro de los siguientes 5 años y se desconoce la causa de esto. Se ha propuesto que están involucrados varios factores como las mutaciones del RE, la selección clonal de las poblaciones resistentes y el metabolismo celular del agente terapéutico, sin embargo las interacciones de las diferentes vías celulares que convergen sobre la ruta de la estimulación estrogénica complican una adecuada interpretación de los hallazgos experimentales⁹⁰(McDonnell 1995).

1.7. Interacción del RE con las vías celulares de señalización.

1.7.1. El RE y la ruta de la adenilato ciclasa.

Durante mucho tiempo se ha pensado que las hormonas esteroideas y la peptídicas actúan por vías distintas; las primeras a través de receptores intracelulares (nucleares) que interactúan con el genoma y las segundas por medio de receptores membranales que modifican actividades citosólicas como la generación de segundos mensajeros como el AMPc.

Sin embargo en un estudio publicado en 1994 se demostró que la estimulación estrogénica, y también la antiestrogénica con tamoxifen (OHT) y el ICI 164,384, incrementan los niveles de AMPc, elevando la actividad de adenilato ciclasa en células de cáncer de mama y de útero tanto in vivo como in vitro por un mecanismo que no implica interacciones a nivel genómico ya que no requiere de síntesis de proteínas o RNAm, sin embargo, sí es necesaria la presencia del RE, dado que en las líneas celulares de cáncer de mama que no expresan el RE no se observa la inducción de AMPc. Este hallazgo involucra la acción de los estrógenos y de los antiestrógenos, vía el RE, en un nivel no genómico pero los mecanismos que operan en estos eventos permanecen desconocidos⁹¹(Aronica 1994).

Por otro lado se ha visto que los agentes que incrementan los niveles de AMPc, como el neurotransmisor dopamina, tienen un efecto sinergista con el E2 sobre la transcripción de los genes controlados por estrógenos y aunque se desconoce el mecanismo por lo que esto ocurre, se propone la hipótesis de que, debido a que la unión del ligando con el RE implica una serie de fosforilaciones en sitios específicos, los efectos del AMPc podrían deberse a la activación transcripcional del RE, en ausencia de hormona, llevando a cabo la fosforilación del receptor^{92,93}(El-Tanani 1996, Power 1991).

Esta teoría ya ha sido postulada para tratar de explicar la interacción del RE con las rutas de transducción de señales de los factores de crecimiento debido a sus propiedades de cinasa. En 1995 O'Malley y sus colaboradores publicaron un artículo que recapitula sus experiencias en esta área y encontraron que, en aparente ausencia de hormona, la activación del receptor se llevaba a cabo por medio de activadores de cinasas o inhibidores de actividad de fosfatasa. También observaron que el RE puede ser activado por la adición de factores de crecimiento⁹⁴(O'Malley 1995).

Sin embargo, y a pesar de toda esta información, a la fecha hace falta mucho para que podamos entender cuales son los fenómenos a nivel bioquímico y molecular que se encuentran en la base de estas evidencias experimentales.

1.7.2. El RE y los protooncogenes nucleares.

Las evidencias experimentales recientes sugieren que los mecanismos de acción estrogénica, para proliferación y diferenciación celular, requieren de un paso de amplificación de la señal originada por el complejo hormona-receptor. Este paso resulta en la expresión de un grupo de genes de respuesta inmediata capaces de controlar la transcripción de otro grupo de genes de respuesta tardía; dichos “amplificadores” de la señal hormonal pueden ser los protooncogenes nucleares⁹⁵(Hyder 1994). Estas moléculas juegan un papel importante en estos procesos celulares y, en general, actúan como componentes o mediadores de las vías de señalización tanto hormonal, como de los factores de crecimiento.

A partir de esta última función es que surge la propuesta de que los protooncogenes actúan como segundos mensajeros en las vías de acción esteroidea. La idea básica es que la región del promotor del protooncogene presenta un elemento de respuesta a estrógenos (ERE) que induce su transcripción después de la estimulación hormonal; posteriormente, el producto proteínico del protooncogen interactúa con la región reguladora de otro gen, que no presenta ERE, para modificar su nivel de expresión genética. Esto inicia una cascada de eventos que culminan con una respuesta celular única y específica^{50,95,96}(Landers 1992, Hyder 1994, Bhattacharyya 1994)

Algunos estudios han mostrado que es posible que tanto el receptor, como el producto proteínico del protooncogene tengan sitios de unión en el promotor de algunos genes y que ambos funcionen independientemente, en este caso la tasa neta de transcripción es el resultado de los efectos de ambos reguladores⁹⁷(Angel 1991). Esto es apoyado por un estudio realizado en células de cáncer de mama en el que se demuestra que la actividad transcripcional del RE es inhibida por c-jun y, en menor medida, por c-fos⁹⁸(Doucas 1991).

Existen informes que muestran que algunos genes contienen “elementos de respuesta compuestos”⁹⁹(Miner 1991) esto es, elementos que median los efectos tanto de los receptores hormonales como de otros factores de transcripción; por ejemplo, fos y jun, y aunque esto ha sido sugerido experimentalmente para el receptor a glucocorticoides parece lógico que, dadas las evidencias, algo similar ocurra en la interacción del RE y los complejos AP1, tanto en la acción transcripcional mediada por los ERE como por los sitios AP1.

Las posibilidades son que el receptor del esteroide y la proteína del protooncogene actúen directamente uno con el otro, en sitios adyacentes en el promotor (co-ocupancia)¹⁰⁰(Diamond 1990), que uno de los factores proteínicos se una al DNA y sirva como “ancla” para la unión del segundo factor por medio de interacciones proteína-proteína, y que, dependiendo del tipo de interacción creado, un gen se apague¹⁰¹(Jonat 1990) ó se

encienda¹⁰²(Gaub 1990). Finalmente la interacción podría llevarse a cabo por inhibición mutua, es decir, puede ocurrir que dos factores interactuen entre sí para prevenir la unión a DNA ó la activación transcripcional, lo que sucede cuando únicamente uno de los factores esta presente¹⁰³(Yang-Yeng 1990).

Dentro de este esquema es importante recordar que los protooncogenes nucleares también son componentes frecuentes de las vías de señalización y transducción celular que son activados por medio de los receptores membranales a los factores de crecimiento, por lo tanto ellos pueden servir como estaciones de relevo para integrar señales provenientes tanto de las hormonas esteroides, como de los factores de crecimiento y así proveer a la célula de un mecanismo sensible a diferentes y múltiples señales y orquestar respuestas integradas al total de estímulos medioambientales⁹⁵(Hider 1994).

Desde esta perspectiva, en los nuevos modelos que se proponen para la acción estrogénica, los primeros eventos se relacionan con los protooncogenes, los que actuarían como genes de “respuesta inmediata”, y sus productos proteínicos, a su vez, funcionarían como activadores transcripcionales en los promotores de otros genes, tanto en tejidos normales, como neoplásicos^{7,104,105,106,107}(Lau 1990, Travers 1987, Murphy 1987, Wiesz 1988, Chiappetta 1990).

La respuesta de los protooncogenes mencionados a la estimulación hormonal ha sido ampliamente documentada, por ejemplo, en el caso de la familia de proteínas myc que está altamente relacionada con los procesos de proliferación y diferenciación celular, se ha demostrado que la expresión de N-myc se manifiesta en cuestión de minutos después de la administración de E2, mientras que c-myc lo hace entre 1-4 hrs. y que la expresión de estos protooncogenes precede a la síntesis de DNA y la proliferación celular por 16-40 hs aproximadamente^{105,106,108}(Murphy 1987, Weisz 1988, van der Burg 1989).

Por otro lado se sabe que los estrógenos también son capaces de inducir la transcripción de c-jun en útero de rata tanto inmadura^{105,109}(Murphy 1987, Web 1993), como adulta^{110,111}(Weisz 1990, Persico 1990), y que regulan la transcripción de los otros miembros de esa familia como jun-D y jun-B. La regulación a nivel transcripcional fue demostrada por que la expresión de RNAm de jun es bloqueado por actinomicina-D (inhibidor de la síntesis RNAm) y no por puomicina o cicloheximida (bloqueadores de síntesis de proteínas). En contraste con este efecto estimulatorio en la rata, los estrógenos disminuyen los niveles de RNAm de c-jun en el oviducto de aves, aproximadamente a los 15' de su inyección, y los datos indican que este efecto también se lleva cabo a nivel transcripcional^{7,112}(Lau 1990, Cohrs 1988).

Con respecto a c-fos, un estudio in vitro señala la presencia de un ERE en la región del promotor del gen murino⁹⁵ (Hyder 1994) y el mismo grupo, anteriormente había demostrado una rápida inducción por E2 de RNAm de c-fos en el útero de ratas inmaduras¹¹³(Loose-Mitchell 1988).

A pesar de esos datos contrastantes derivados de experimentos con roedores y aves,

las evidencias sugieren que los estrógenos regulan, a la alta o a la baja, los protooncogenes myc, fos, c-jun, jun-D y jun-B y que estos funcionan como reguladores en las fases tempranas de las vías de acción estrogénica. Las diferencias pueden deberse a la presencia de factores tejido-específicos que interactúan con el receptor.

Es importante señalar que la mayoría de estos estudios se han realizado en roedores, aves o en su defecto en líneas celulares derivadas de tumores humanos (principalmente cáncer de mama) y que, debido a la heterogeneidad de respuesta tanto específica de especie como, incluso, entre los diferentes tejidos en un mismo organismo, es claro que la respuesta a la estimulación estrogénica es una condición que depende de otros factores que se encuentran en el medio ambiente celular y/o tisular.

1.7.3. El RE y los factores de crecimiento

La otra ruta que se ha relacionado estrechamente con la respuesta celular a la estimulación estrogénica es la de los factores de crecimiento, que inician una cascada de señalización celular a partir de la unión con sus receptores específicos localizados en membrana plasmática. Los factores de crecimiento que se han relacionado, en base a evidencias experimentales, con el efecto estrogénico, son el factor de crecimiento epidérmico (EGF)^{114,115,116,117,118,119} (Nelson 1991, Ignar trowbridge 1992, 1994, 1996, Chabos 1994, Mouihate 1995) y el factor de crecimiento similar a insulina-1(IGF-1)^{18,96,118,120,121} (Ma 1994, Bhattacharyya 1994, Chabos 1994, Huynh 1993, Newton 1994).

Ya desde la década pasada el grupo de Stancel había establecido que los estrógenos inducen la transcripción de RNAm del receptor al factor de crecimiento epidérmico (EGFr)^{122,123} (Mukku 1985, Lingham 1988) y paralelamente otro grupo¹⁰⁵ (Murphy 1987) había demostrado la inducción transcripcional del IGF-1 por estrógenos en el útero de rata. Esto hizo patente la conexión que existe entre las vías de señalización hormonal y la de transducción de señales membranales iniciada por los factores de crecimiento.

A partir de estudios mas recientes es evidente que la proliferación inducida por estrógenos involucra la acción de los factores de crecimiento (GF); éstos y sus receptores ejercen funciones importantes en los eventos proliferativos y de diferenciación tanto tempranos como tardíos en los tejidos de respuesta estrogénica tanto in vivo como en líneas celulares tumorales^{96,115} (Bhattachayya 1994, Ignar-trowbridge 1992).

Se ha demostrado que el EGF es un potente mitógeno en cultivo celular uterino de ratón¹²⁴ (Tomooka 1986). También que los antiestrógenos bloquean el efecto proliferativo del EGF en dos líneas de adenocarcinoma endometrial humano¹¹⁶ (Ignar-Trowbridge 1993) y que, en el útero de rata ovariectomizada este factor puede imitar los efectos estrogénicos en cuanto a proliferación se refiere y este efecto también se inhibe con antiestrógenos¹¹⁵ (Ignar-Trowbidge 1992). Asimismo se ha probado que los antiestrógenos antagonizan el efecto inductor del EGF sobre la síntesis del receptor de progesterona en células uterinas en cultivo¹²⁵ (Sumida 1989). Por otro lado, en un estudio in vivo, se ha

documentado que los anticuerpos anti-EGF inhiben significativamente la proliferación inducida por E₂, tanto en útero como en vagina de rata¹¹⁴(Nelson 1991).

Estos datos sugieren fuertemente que la inducción de procesos fisiológicos por estrógenos que incluyen proliferación y diferenciación están mediados por la interacción EGF-EGFr, aunque los mecanismos involucrados están todavía por dilucidarse.

Otro factor de crecimiento que se ha relacionado con la respuesta estrogénica es el factor de crecimiento similar a insulina-I (IGF-I). Existe evidencia de que regula la respuesta estrogénica en una línea de células tumorales de hipófisis (GH3) e incluso esta respuesta es inhibida, en ausencia de estrógenos, por el antiestrógeno puro ICI 164384, además induce la actividad de luciferasa del gene reportero ERE-LUC¹²¹(Newton 1994). Una evidencia similar se demostró en una línea celular derivada de un neuroblastoma¹⁸(Ma 1994).

1.8. Modelo propuesto para la acción de los estrógenos.

Estos hallazgos han llevado a los investigadores en el campo a modificar la visión lineal en cuanto a la interacción entre las hormonas esteroideas y los factores peptídicos de crecimiento, la cual estaba fundamentada en los estudios que demostraban que la estimulación estrogénica inducía la síntesis de estos factores y que posteriormente estos ejercían su efecto en las células de forma endócrina.

En una revisión publicada en 1994 sobre las posibles vías de comunicación genómica entre el receptor de estrógenos y los factores de crecimiento, los autores, basados en muchas de la evidencias anteriormente señaladas, proponen una hipótesis alterna a esta idea y sugieren que existe un efecto “directo permisivo” en el cual el receptor de estrógenos actúa paralelamente con las vías de transducción de señales iniciadas por los factores de crecimiento, los cuales actúan de manera parácrina, e incluso autócrina, facilitando su función, tanto a nivel genómico como con una serie de interacciones proteína-proteína¹¹⁸(Chalbos 1994).

Con base en estas evidencias parece claro que un modelo más actualizado de los mecanismos de la acción estrogénica en los tejidos “blanco” debe incluir las siguientes premisas, algunas de las cuales se encuentran representadas en la **fig. 9**.

- 1.- El RE se puede unir a DNA sin necesidad del ligando.
- 2.- La unión con el ligando fortalece la unión a DNA y permite el reclutamiento de otros factores de transcripción necesarios para la activación del gen.
- 3.- El RE actúa sobre los genes de respuesta temprana (como los protooncogenes) y desencadena una cascada de eventos moleculares.
- 4.- El RE realiza interacciones proteína-proteína en los genes de respuesta tardía para posibilitar la activación transcripcional.
- 5.- Las rutas de señalización celular iniciadas por los factores de crecimiento son capaces, en algunas circunstancias, de activar transcripcionalmente el RE.
- 6.- Los ERE pudieran ser “elementos de respuesta compuestos”, que actúan en co-

ocupancia activando la transcripción; de manera independiente, coordinada ó en inhibición mutua entre el RE y otros factores de transcripción.

7.- El RE se puede unir a DNA en forma de heterodímero en complejo con oncoproteínas ó con otros factores de transcripción desconocidos.

9.- La estructura de la cromatina influye en la actividad de todos los factores de transcripción y es probable que se establezca con ellos una interacción dinámica.

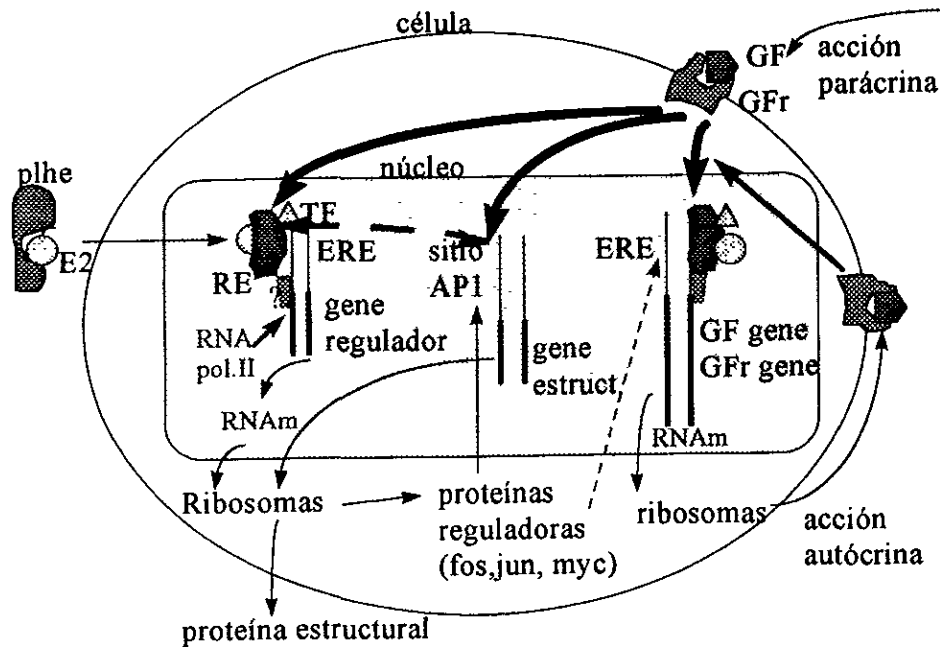


Fig. 9 Posibles mecanismos de la acción de los estrógenos. plhe (proteína ligadora de hormonas esteroides). E2 (17β estradiol). RE (receptor de estrógenos). ERE (elemento de respuesta a estrógenos). GF (factores de crecimiento). GFr (receptor a factores de crecimiento). RNA pol II (RNA polimerasa II). TF (factores de transcripción). (Tomado de Barrón 1997¹²⁶)

Recientemente nuestro grupo publicó una revisión extensa sobre la estructura y función del receptor de estrógenos en donde se plasman muchas de las interrogantes que existen en la actualidad sobre el papel real que esta proteína nuclear tiene dentro del contexto celular en los tejidos de respuesta a la estimulación estrogénica ¹²⁶(Barrón y cols. 1997). Todas las evidencias encontradas hacen patente que aún falta mucho por dilucidar con respecto a los mecanismos moleculares que subyacen a las rutas de proliferación y diferenciación celular en estos tejidos, los cuales son importantes en la fisiología y fisiopatología de los órganos dependientes de esta hormona.

1.9. Utilidad de los cultivos celulares.

En las condiciones adecuadas la mayoría de las células vegetales y animales pueden vivir, multiplicarse y expresar sus características de diferenciación al cultivarse sobre un soporte apropiado, esto es un cultivo celular "in vitro". Esta posibilidad ha sido de gran importancia en el estudio de los procesos celulares internos ya que permiten realizar análisis ultraestructurales, bioquímicos y moleculares de las células en condiciones controladas y observar los efectos de agregar o retirar moléculas específicas. Los cultivos obtenidos directamente de los tejidos normales de un organismo se denominan cultivos primarios y en general conservan muchas de las características propias del tejido del cual se provienen, esto hace posible analizar eventos celulares que no es posible, o es sumamente complicado o costoso, en los tejidos intactos dentro del organismo¹²⁷(Alberts 1994).

Uno de los puntos críticos en el inicio de los cultivos celulares de mamífero fue el establecimiento de las condiciones nutritivas que se requieren para el sano desarrollo de los cultivos. Esto fue superado con la adición de suero fetal de algunas especies de mamíferos que proporciona los elementos necesarios para el desarrollo de las células en cultivo. Estos cultivos "in vitro" se realizan en recipientes de plástico que han sido tratados para la adhesión de las células a esta superficie y en condiciones de esterilidad para evitar contaminación de origen biológico¹²⁸(Reid 1984).

Desafortunadamente los cultivos primarios de células normales de mamífero tienen la limitante de que mueren después de un número reducido de divisiones (aproximadamente 50). Esto hizo necesario el desarrollo de métodos para obtener células inmortalizadas que no presentaran esta limitante y permitieran un estudio más profundo de sus características, esto se logró por dos vías diferentes; la primera es la obtención de células de origen tumoral que han sido inmortalizadas "in situ" (vg. Las células HeLa obtenidas de un carcinoma cervicouterino humano), la segunda consiste en la transformación "in vitro" de células normales con oncogenes virales que son capaces de inmortalizar ciertos tipos celulares (vg. el antígeno T largo de SV-40)¹²⁹(Adams 1990).

Las células en cultivo presentan una población homogénea reproduciéndose en un medioambiente constante que puede ser modificado, dentro de ciertos límites, para investigar el efecto de diversos factores físico-químicos así como de la adición de moléculas orgánicas sobre el crecimiento y fisiología de estas células. Estos eventos pueden ser estudiados en periodos cortos y en forma relativamente fácil lo cual es una de las principales ventajas sobre los sistemas que utilizan los organismos íntegros, además de que evita las implicaciones éticas que el uso de animales de experimentación implica¹²⁹(Adams 1990).

Echeverría y cols. en 1980¹³⁰ publicaron uno de los primeros intentos que se hicieron para aislar, cultivar y estudiar la fisiología de las células de epitelio endometrial en el que proponen un método para la obtención de las células de este tejido, tanto en ratas normales como ovariectomizadas y observan el efecto inductor de los estrógenos en la incorporación de timidina tritiada, es decir en el incremento de la actividad transcripcional y migración de RNAm al citoplasma.

1.10. Línea celular RENTRO 1.

La línea celular denominada RENTRO 1 establecida en el laboratorio de Biología Molecular e Investigación en Cáncer (Marburg, Alemania) por Whiele¹³¹ se obtuvo a partir de cultivo primario de epitelio endometrial de rata y fue inmortalizada, en primera instancia, con un vector viral no replicante que contiene el antígeno T largo del virus de los simios 40 (SV-40) y el gen bacteriano que codifica para la enzima neomicin-fosforiltransferasa (*neo*), que confiere resistencia a neomicina y, en segunda instancia, con el oncogene viral Ha-ras. Esta línea no expresa el gen endógeno que codifica para el RE.

La caracterización de la línea demostró la expresión de las citoqueratinas número 8, 18 y 19 al crecer sobre una monocapa de células NIH3T3 (fibroblastos de ratón) fijadas con formalina, lo cual concuerda con su origen epitelial, pero la expresión era claramente menor cuando crecían sobre plástico. Por otro lado no se demostró actividad de fosfatasa alcalina, en ninguno de ambos sustratos en la presencia de 10^{-7} M de dietilestilbestrol (DES). La actividad de esta enzima es considerada como un marcador altamente efectivo de tejido endometrial en respuesta a estimulación estrogénica, aunque en este caso parece obvio que su ausencia se debe a la falta de expresión del RE.

También se demostró que cuando crecen sobre plástico no expresan el filamento intermediario vimentina, que es característico de las células de origen fibroblástico o estromal, pero si lo hacen cuando crecen sobre células NIH3T3 (fibroblastos de ratón) (Tabla 1).

CK8		CK18		CK19		VIMENTINA	
Plástico	3T3	Plástico	3T3	plástico	3T3	Plástico	3T3
+	++	-	++	-	+++	-	+++

CK= citoqueratina

3T3= cultivo crecido sobre monocapa de células NIH3T3.

Tabla 1. Detección de filamentos intermediarios en Rentro 1. (Técnica Inmunoperoxidasa, Tomado de Whiele 1990¹³¹).

Estas evidencias podrían indicar un origen mixto epitelio-estromal para la línea, pero existe la posibilidad de que esos cambios en los marcadores de diferenciación se deban a los dos pasos de inmortalización, a la descontextualización tisular que las células sufren en cultivo y/o a la pérdida de polarización que las células epiteliales podrían sufrir al perder el contacto con la membrana basal que en condiciones in útero las sustenta.

Los niveles de expresión de los receptores hormonales fueron determinados por ensayos de unión hormona-receptor (Binding) y por detección inmunoenzimática y no se registró la expresión del RE en ninguna de las dos instancias, el receptor de Progesterona (RP) se detecta en muy bajos niveles, lo cual podría ser una consecuencia de la falta de expresión del RE, y el receptor a glucocorticoides (RG) se encuentra en niveles normales (tabla 2).

RP * (X10 ³)	Kd (nM)	RG* (x10 ³)	Kd (nM)	REc* (x10 ³)	Kd (nM)	REn* (x10 ³)	Kd (nM)
0.7	-	22.3	1.4	0	-	0	-

*= sitios por célula

Rpg= Receptor de progesterona

RG= Receptor a glucocorticoides

RE= Receptor de estrógenos, c= citosólico, n= nuclear.

Tabla 2. Niveles de expresión de receptores hormonales en Rentro 1 (Ensayos de unión hormona-receptor, tomado de Whiele 1990¹³¹).

1.11. Sistema de regulación de la expresión genética.

Este es un sistema desarrollado por Gossen y Bujard en 1992¹³² que utiliza elementos reguladores genéticos procarióticos y virales para establecer un sistema de regulación positiva de la expresión genética en células eucarióticas, a partir de tetraciclina adicionada al medio de cultivo, el sistema es dosis dependiente del antibiótico.

Consta de dos plásmidos; el primero es el que codifica para un transactivador proteico 37 KDa que activa transcripcionalmente al segundo plásmido, el operador, en el cual se ha insertado el gen de interés, es decir el gen del cual se quiere regular su expresión.

Este sistema de regulación de la expresión genética utiliza la secuencia que codifica para los elementos de resistencia específicos a tetraciclina (**tet**) codificados en el operón Tn 10 (transposon 10) de *E. coli*, en el cual la transcripción de los genes mediadores de la resistencia están regulados negativamente por el represor de tetraciclina (**tetRep**). El producto proteico de este elemento regulador está unido, en ausencia de tet, a una secuencia consenso en la región promotora del operon, denominada operador de tetraciclina (**tetOp**). Cuando el antibiótico se encuentra presente en el medio el tetRep se une al antibiótico y se desliga del tetOp lo que activa la transcripción de los genes codificados por el operon^{133,134} (Hillen 1983, Hinrichs 1994).

La secuencia que codifica para los 207 aa. del tetRep se unió al extremo 5' de la secuencia codificante de los 130 aa. del dominio de activación de la proteína viral 16 (VP 16) del virus del herpes simple (HSV), se le agregó el extremo terminal de poliadenina (**poliA**) de SV40 y contiene, además, la secuencia de resistencia a ampicilina (**Pbla**) y neomicina (**neo**). Este plásmido se denomina **pUHD 15-1neo** o **pTetOff**. esta controlado por el promotor de citomegalovirus humano IE (**PhCMV**) (fig. 10) y codifica para una proteína de 37 KDa de peso molecular y 337 aa. que se conoce como transactivador de tetraciclina (**tetTa**).

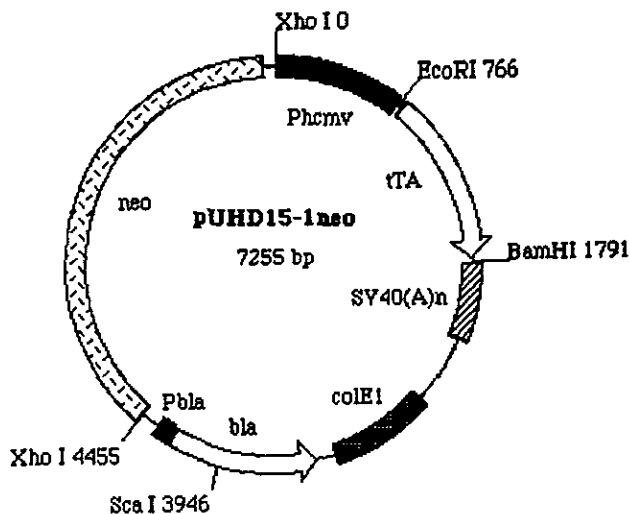


Fig. 10 Construcción del pUHD 15-1neo .

La construcción del plásmido de respuesta al tetTA se realizó fusionando un heptámero del palíndromo invertido de 19 pares de bases de la secuencia 02 del Tn10 (TCCCTATCAGTGATAGAGA-TCTCTATCACTGATAGGGA) de *E. Coli*, esto es el tetOp, en el extremo 5' de un fragmento del promotor de hCMV que contiene del nucleótido -53 al +75, denominado promotor mínimo de hCMV (**PhCMV min**) en cuyo extremo 3' se insertó un sitio de multiclonación (MCS) en el que se puede insertar el gene de interés, posteriormente se le agrego el extremo de poliA de SV 40. El plásmido se denomina **pUHD 10-3** o **pTRE** (plásmido del elemento de respuesta a tetraciclina) (fig. 11)

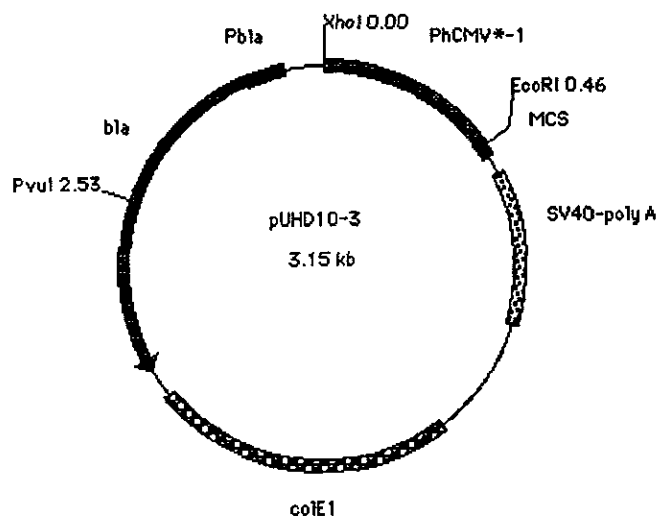


Fig. 11 Construcción del pUHD 10-3 o pTRE, el gene de HEGO fue clonado en el sitio Eco R1 del MCS.

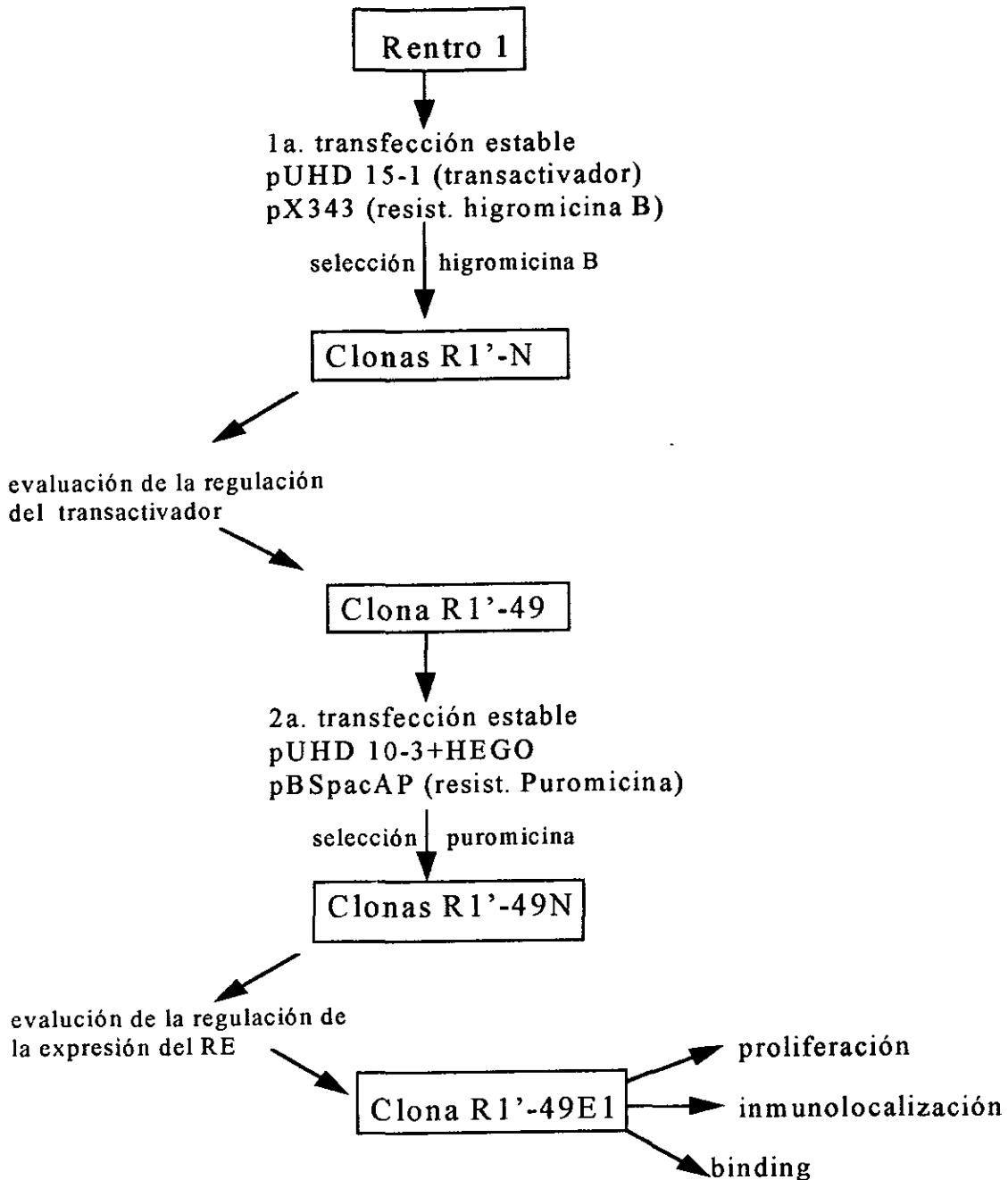
El tetTA se une, en ausencia de tet, a esta construcción en la secuencia de 19 pb invertida como un dímero de 46 Kda de peso molecular y activa transcripcionalmente el gene o secuencia codificante que se encuentre en el extremo 3' del PhCMV min. Cuando el antibiótico se encuentra en el medio el tetTA no se une al promotor y la transcripción no se inicia.

2. OBJETIVO.

Por todas las interrogantes, antes detalladas, que subsisten con respecto a la Biología del RE es que nos planteamos el objetivo de desarrollar una línea celular en la que sea posible regular la expresión del RE y que nos sirva como modelo para coadyuvar a establecer cuál es el papel real que el receptor de estrógenos tiene en la proliferación de las células endometriales.

3. Material y métodos.

Diagrama de flujo



3.1. Líneas celulares

Utilizamos la línea celular denominada RENTRO 1 para implantarle el sistema de regulación de la expresión genética de Gossen y Bujard ya que esta no expresa el gen endógeno que codifica para el RE.

Como control positivo en los ensayos de expresión del gen reportero de luciferasa

(LUC) se utilizó la línea celular HeLa-tet generada por Gossen y Bujard en 1992 en el centro de Biología Molecular de la Universidad de Heidelberg, Alemania, a partir de células HeLa (carcinoma cervicouterino humano) transfectadas establemente con el plásmido que codifica para el transactivador de tetraciclina (tetTA) (Gossen 1992)¹³².

3.2. Condiciones de cultivo.

Las células RENTRO1 y HeLa-tet se mantuvieron en medio de Eagle modificado por Dulbecco (D-MEM, GIBCO-BRL), suplementado con 10% de suero bovino fetal (SBF, GIBCO-BRL), 2 mM de glutamina (SIGMA), 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina (GIBCO) y 40 U/ml de insulina. Tanto RENTRO 1, HeLa-tet, como las clonas obtenidas en nuestro laboratorio se crecieron en una incubadora (Forma Scientific) a 37°C, con atmósfera de 5% de CO₂ y 95% de aire.

El medio de cultivo de la clona producto de la primera transfección estable se suplementó con 50µg/ml de higromicina B (SIGMA), el cual fue utilizado como antibiótico de selección. Las clonas positivas para la segunda transfección estable se mantuvieron y seleccionaron en el medio anterior suplementado con 10µg/ml de puomicina (SIGMA).

3.3. Plásmidos

Para la primera transfección estable se usó el plásmido pUHD-15-1 y se co-transfectó con el plásmido pX343 de resistencia a higromicina B. La primera transfección transitoria se realizó con el plásmido reportero tetOp-luc o pUHC 13-3 que consiste en el pUHD10-3 con la inserción del gene de Luciferasa.

Para la segunda transfección estable se utilizó el plásmido pUHD 10-3 al cual se le inserto en el sitio de restricción Eco RI del MCS el gen que codifica para el receptor de estrógenos humano (HEGO). Este se cotransfectó con el plásmido pBSpacAP que codifica para resistencia a puomicina y, finalmente, en la segunda transfección transitoria se usó el gen reportero ERE-CAT.

En las dos transfecciones transientes se usó el gen reportero de βgal (LAC Z de *E. coli*) como control interno de la eficiencia de transfección.

3.4. Transfecciones transitorias

Todas la tranfecciones se realizaron por la técnica de co-precipitación con fosfato de calcio, incubación con el precipitado de DNA por 6 hrs. y choque con glicerol 15 % durante 2'(Ausubel 1997¹³⁵). Después de la transfección las células, se cultivaron por 48 hrs, se levantó la monocapa por raspado y se lisaron por congelamiento-descongelamiento. Se almacenaron a -20°C para su posterior uso en los ensayos de expresión de genes reporteros.

3.5. Transfecciones estables.

Estas transfecciones se realizaron por el mismo método pero con la diferencia de que en la mezcla de DNA se agregó un plásmido de resistencia a un antibiótico, para la primera se uso el de higromicina y para la segunda el de puromicina para que la selección de las clonas positivamente transfectadas se efectúe con estos antibióticos. La diferencia fundamental estriba en que las clonas establemente transfectadas se conservan como líneas permanentes¹³⁵(Ausubel 1997).

3.6. Recuperación de las clonas establemente transfectadas

Después del periodo de selección con el antibiótico, aproximadamente 30 días, se recuperaron las clonas, bajo observación con microscopio estereoscópico, con una micropipeta con punta de 200 μ l. de capacidad, cada colonia fue pasada a una caja y crecidas en monocapa para su posterior análisis con el gen reportero adecuado.

3.7. Análisis de la expresión de genes reporteros

3.7.1. Luciferasa (LUC)

Las clonas producto de la primera transfección estable fueron sometidas al ensayo de regulación de la expresión del tetTA por medio del gen reportero de luciferasa¹³⁶(Brasier 1992) que fueron realizados con el plásmido tetOp-LUC o pUHC 13-3¹³⁷(Deuschle 1989), de acuerdo a la técnica descrita previamente¹³⁵(Ausubel 1997)

En la primera fase se hicieron ensayos de “todo o nada”, es decir, en ausencia y presencia de 1.0 μ g/ml de tet, y las clonas que registraron la actividad del reportero se incluyeron en la siguiente fase. Esta consistió en una curva dosis-respuesta en función de concentraciones crecientes de tet dentro del rango de 0-1 μ g/ml.

El registro de la emisión de luz se realizó en un luminómetro Bio-Orbit modelo 1251, los datos se analizaron con el programa Multiuse 1.01 (Bio-Orbit).

La clona que expresó la actividad de LUC en función de tet en forma dosis-dependiente se pasó a la segunda transfección estable.

3.7.2. Cloramfenicol acetil transferasa (CAT)

Las clonas producto de la segunda transfección estable fueron sometidas a ensayos de regulación de la expresión del gen que codifica para el RE. Para esto se utilizó un plásmido reportero que contiene el gen de la enzima cloramfenicol acetil-transferasa (CAT), controlado por el ERE, lo cual genera el plásmido ERE-CAT. Igualmente se realizó en dos etapas; la primera en ensayos de “todo o nada” con la adición de E2 (10^{-7} M), en ambos casos, y en presencia o ausencia de tetraciclina (4 μ g/ml), y las clonas que demostraban la presencia de RE pasaban a una segunda fase en la que se realizaron curvas dosis-respuesta

en donde se mantuvo la misma concentración de E₂ y se observó la respuesta del reportero a concentraciones crecientes de tet (0-4 µg/ml).

Estos experimentos se realizaron en medio D-MEM sin rojo fenol (GIBCO), suplementado con 2 mM de glutamina (GIBCO), 100 U penicilina/100µg estreptomicina y 10% de suero bovino fetal, el cual fue tratado previamente con carbón activado (CSS), con el fin de eliminar las hormonas esteroides.

La actividad de CAT se evaluó por medio de cromatografía en capa fina con cloramfenicol marcado con C¹⁴ y revelado por autoradiografía ¹³⁸(Sambrok 1989). El análisis se realizó por medio de densitometría con el programa Collage 2.0 (Image Dynamics Corp.) y los resultados corregidos por actividad de β galactosidasa que se usó como control interno para evaluar la eficiencia de transfección y contar un dato numérico que nos permitiera corregir los datos obtenidos con los dos ensayos anteriormente descritos.

3.8. Cuenta celular:

Las células se cultivaron en medio específico para cada clona en cajas de cultivo de 6 pozos. Se sembraron 2x10⁴ células y a las 24 hrs se inició el conteo (tiempo cero); posteriormente se midió la densidad celular a las 48 y 96 horas. El número total de células se evaluó en un Coulter, modelo T-660. Los conteos se realizaron por triplicado y los resultados se analizaron por medio de ANOVA con el programa Stat View 4.0.

3.9. Inmunohistoquímica del receptor de estrógenos

Una vez que se obtuvo la clona que en los ensayos funcionales con los genes reporteros había mostrado la expresión del RE regulada por tet, se procedió a la inmunolocalización del receptor tanto en esta clona como en las progenitoras.

Las células se cultivaron en cubreobjetos, previamente esterilizados en autoclave, en el medio de cultivo específico para cada clona, cuando las monocapas alcanzaron el 90% de confluencia se fijaron con metanol absoluto durante 5 min. Para la inmunolocalización del RE se utilizó el anticuerpo monoclonal de raton anti-RE humano (DAKO M-7047, clona 1D5), la detección se realizó con el sistema LSAB (DAKO) de acuerdo al protocolo del fabricante, que incluye el bloqueo de la actividad endógena de peroxidasa con peróxido de hidrogeno al 3%, incubación con el anticuerpo primario (30', temp. Amb.), lavados con PBS e incubación con el anticuerpo secundario biotinilado (elaborado en cabra anti-raton), incubación con el complejo estreptavidina-peroxidasa, lavados y revelado con diaminobencidina, la cual en caso de positividad arroja un precipitado café oscuro en la zona de actividad enzimática. La contra-tinción se realizó con hematoxilina de Harris. Las laminillas fueron observadas y fotografiadas en campo claro con un microscopio AxiosKop Carl Zeiss.

3.10. Análisis de unión hormona-receptor¹³⁹

Se sembraron 2×10^4 células en placas de 4 pozos en 500 μ l de medio y se incubaron durante 48 hrs. Posteriormente se realizó el análisis de unión hormona-receptor de acuerdo al siguiente protocolo: se incubaron las células durante 4 hrs. a 37°C en D-MEM sin rojo fenol y sin SBF, suplementado con 1% de albúmina sérica bovina (Fracción V, SIGMA) y se agregaron concentraciones crecientes de la hormona marcada (2,4,6,7-³H- estradiol, actividad específica 72 μ Ci/mM, Amersham) a todos los pozos, y en los numerados 3 y 4 se adicionó, además, una concentración fija (5×10^{-7} M) de hormona sin marcar (17 β -estradiol, SIGMA).

Se lavaron 3 veces con el mismo medio y se lisaron las células con NaOH 1M durante 16 hrs., se neutralizó con HCl 1 M, Finalmente la radioactividad de los lisados se midió en un contador de centelleo líquido, los parámetros termodinámicos, Bmax y Kd, se determinaron por medio de regresión no lineal ajustada a una hipérbola, utilizando el programa Prism (Graph Pad Software, San Diego Ca, USA). Los ensayos se realizaron por duplicado para cada una de las concentraciones de hormona marcada.

3.11. Determinación de concentración de proteínas

Para la determinación de concentración de proteínas se usó el método de Bradford¹⁴⁰ (Bradford 1975) y las lecturas se realizaron en un espectrofotómetro Beckman modelo DU-65.

3.12. Transformación bacteriana para amplificación de plásmidos.

Para la elaboración de células competentes se utilizó la cepa DH5- α de E coli aplicando la metodología descrita en Ausubel 1997¹³⁵. La transformación se llevó a cabo por medio de la adición de 10 ng del plásmido a amplificar por cada 100 μ l de células competentes y choque térmico a 42°C por 90'', posteriormente se sembró en placas de agar LB-Broth con 100 μ g/ml de ampicilina. La amplificación, cosecha y purificación de los plásmidos se realizó con la técnica de maxiprep (Sambrook 1989)¹³⁸, utilizando la lisis alcalina y la purificación por precipitación con Polietilenglicol. (PEG).

Los plásmidos resultantes se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1% con bromuro de etidio como revelador.

4. Resultados.

4.1. Obtención de la línea celular R1'-49.

A partir de la línea Rentrol y como resultado de la transfección estable con el gen que codifica para el tetTA se tomaron 60 colonias celulares, las cuales fueron analizadas para evaluar la presencia del tetTA en forma estable, a través de medir su capacidad de activar al operador tetOp, el cual esta fusionado a una secuencia de expresión de luciferasa (la actividad de esta enzima esta relacionada en forma directa con la activación del operador) en el plásmido pUHC 13-3. Como se puede ver en la figura 12 la clona R1'-49 expresa el tetTA y su acción es regulada en forma dosis-dependiente de tetraciclina adicionada al medio.

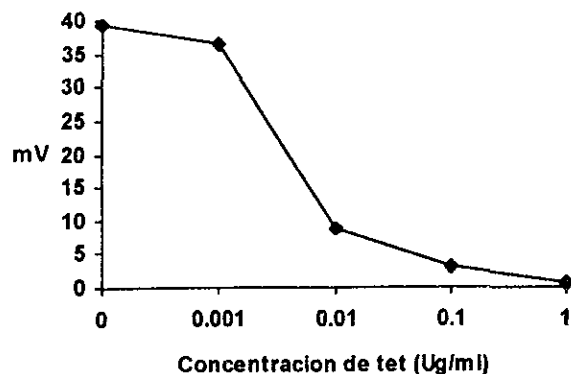


Fig. 12 Curva dosis-respuesta de tetraciclina. Los resultados muestran la actividad del gen reportero de luciferasa en la clona R1'-49 expresados en miliVolts (mV). Datos de un experimento representativo.

4.2. Obtención de la clona R1'-49E1

La clona R1'-49 fue transfectada en forma estable con el pTRE-HEGO y se tomaron 120 colonias resistentes a puromicina. Todas fueron analizadas para evaluar la expresión del RE por medio de transfecciones transitorias con el gen reportero ERE-CAT en presencia o ausencia de tetraciclina y 17β -estradiol. Se encontró que el 10% de estas clonas expresan RE en forma diferente, pero se eligió a la clona R1'-49E1 debido a que presentó una regulación de la expresión del RE en forma dosis dependiente de tetraciclina. En la figura 13 se muestra que la actividad de CAT en el grupo de células que fueron tratadas con diferentes concentraciones (0-4 $\mu\text{g/ml}$) de tetraciclina fue disminuyendo conforme se aumentó la concentración de este antibiótico.

Actividad específica de CAT

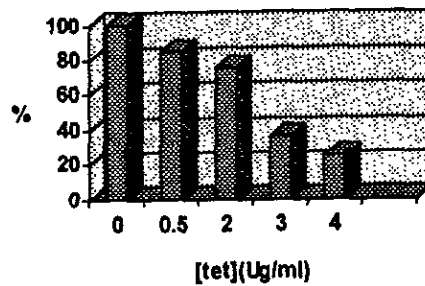


Fig. 13 Regulación de la actividad del gen reportero de CAT por tetraciclina. Resultados promedio de dos experimentos por duplicado y se expresan en porcentaje de actividad de CAT. (Resultados corregidos por actividad de β gal.)

4.3. Proliferación celular.

La figura 14 muestra los resultados de las cinéticas de crecimiento para líneas celulares involucradas en este estudio. Los cuentas se realizaron por triplicado al tiempo cero, las 48 y 96 horas. Las células fueron cultivadas en los medios y las condiciones habituales de cultivo para cada una de ellas. El ANOVA determina diferencias significativas entre las tres líneas a las 48 y 96 horas ($p < 0.001$)

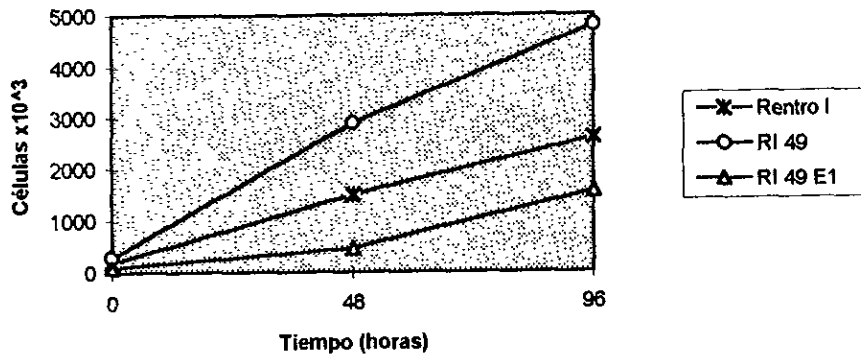


Fig. 14 Cinética de crecimiento de las líneas celulares. Los datos son el resultado de un experimento por triplicado. Las diferencias entre grupos se analizó por ANOVA con el programa Stat View 4.0. * $p < 0.001$.

4.4. Inmunolocalización del RE

Como parte de la caracterización de la clona R1'49E1 se realizó la localización *in situ* del receptor por medio del anticuerpo monoclonal anti-RE humano tanto en Rentro 1,

como en R1'-49 y R1'-49E1. Como se puede observar en la fig 15 (a,b y c) el receptor de estrógenos solo se detecta en la clona que tiene el sistema de regulación integrado en forma estable (R1'-49E1).

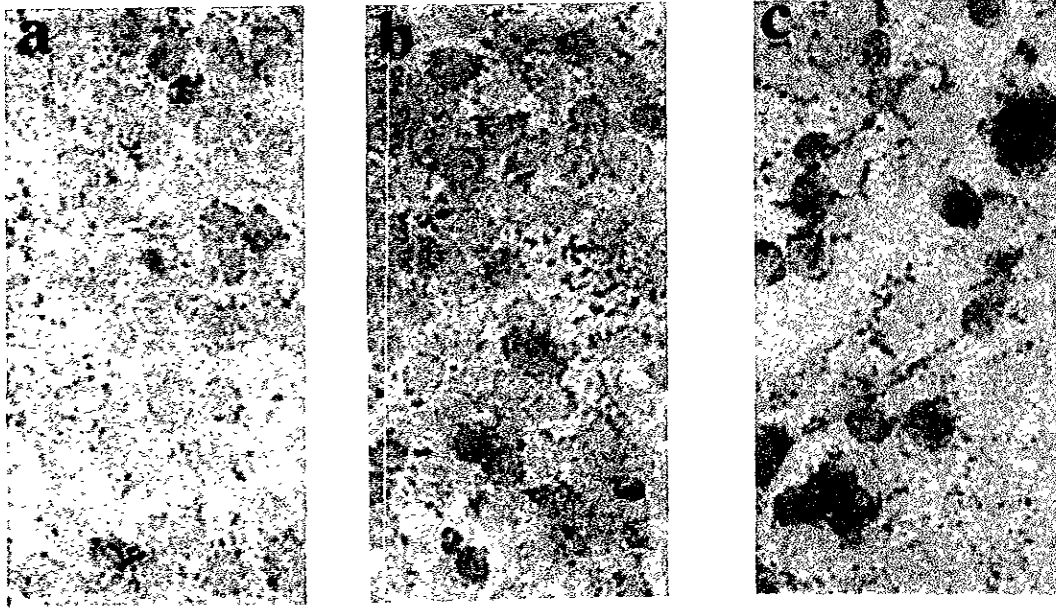
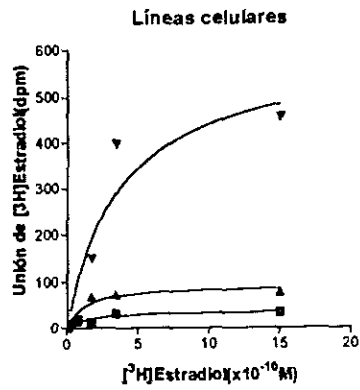


Fig. 15 Immunolocalización del RE en las líneas celulares: Rentro 1 (a), R1'-49 (b) y R1'-49E1 (c). (Sistema Anti-RE humano-HRP-DAB, contra-tinción con hematoxilina de Harris. 40x)

4.5. Análisis de unión hormona-receptor

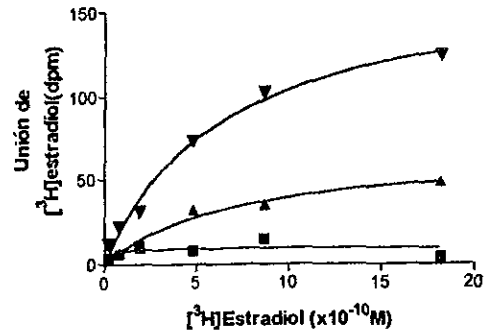
Con el fin de obtener información cuantitativa sobre los niveles de expresión del RE en las células de la clona seleccionada se realizó este análisis que proporciona los datos tanto de número de sitios de unión para el ligando, como la constante de disociación (Kd) entre el receptor y la hormona. En la fig. 16A se puede observar que para Rentro 1 y R1'-49 la curva de unión específica no muestra variación de acuerdo a la concentración de hormona marcada, lo que implica la ausencia de sitios de unión en las células de esta línea; sin embargo, para R1'-49E1 la curva muestra claramente la tendencia a la saturación. En la fig. 16B se muestran las curvas y los datos de los ensayos dosis-respuesta en función de tet para esta última clona.

A



B

R1'-49E1
Ensayo de unión hormona-RE



■ Rntrol
▲ R1'-49
▼ R1'-49E1

	<i>Kd</i> (nM)	No. RE/célula
■ 4 Ug/ml tet	0.026	450
▲ 2 Ug/ml tet	0.68	3,200
▼ s/tet	0.65	10,000

Fig. 16 Curvas de saturación por competencia de unión hormona-receptor. Las gráficas muestran los resultados de un experimento representativo realizado por duplicado.

5. Discusión y conclusiones.

El uso de líneas celulares para el estudio de los procesos internos de las células ha constituido un hito importante en establecimiento de los mecanismos moleculares que subyacen al fenotipo celular o tisular. En el caso de los cánceres hormono-dependientes este hecho ha sido de principal importancia ya que la mayor parte del conocimiento que se tiene sobre los procesos involucrados en la transformación neoplásica y el mantenimiento de los tumores en este tipo de tejidos se ha obtenido de trabajos con líneas tumorales, principalmente de mama, aunque también se ha usado tejido hipofisiario, óseo y ovárico. En principio se puede decir que un tumor originado de un tejido dependiente de hormonas, tiene una alta probabilidad de a su vez , presentar esta dependencia, aunque esto no ocurre en todos los casos.

El estatus de los receptores hormonales en estos tejidos tumorales ha sido de importancia decisiva para el manejo clínico de los pacientes sobre todo considerando las condiciones drásticas y de riesgo que implican tanto la quimioterapia como la radioterapia para el paciente y, aunque se ha avanzado mucho en este campo, aun persiste un gran desconocimiento sobre los procesos internos que determinan la respuesta o la resistencia a los tratamientos hormonales.

Esta falta de conocimiento es particularmente importante en la progresión hacia un estado de independencia hormonal de tumores que originalmente requerían de la estimulación hormonal para proliferar. También es de singular interés la interrogante sobre la respuesta al tratamiento con antiestrógenos de los tumores que no expresan el RE, además de los mecanismos involucrados en la expresión endógena del gen que codifica para este receptor.

De cualquier modo se ha visto que los procesos que conducen a transformación neoplásica generalmente también tienden a producir un cierto grado de desdiferenciación en las células tumorales por lo que las condiciones que presenta una línea tumoral no necesariamente corresponden a la del tejido del cual se originan.

En el caso particular de las patologías endometriales asociadas a estimulación hormonal el desconocimiento es aún mayor ya que no se cuenta con líneas tumorales en las que se pueden estudiar estos procesos.

Es por esto que con el presente trabajo intentamos desarrollar una línea de células epiteliales de endometrio de rata, que expresara el receptor de estrógenos de una manera regulable y que sirva de modelo para estudiar la manera en la cual este receptor está involucrado en los procesos de proliferación y diferenciación de este tipo de células, para ello nos abocamos a introducir en forma estable un grupo de vectores que contienen las secuencias que integran un sistema de regulación de la expresión del gen que codifica para la forma silvestre del RE humano (HEGO), a través de la simple adición de tetraciclina al medio de cultivo.

Es obvio que un sistema de esta naturaleza tiene que ser insertado en un tipo celular que no exprese de manera endógena el gen que se está estudiando porque de otra forma no es posible saber si la expresión observada es debida al gen foráneo o al propio de la célula. Es por esta razón que el sistema se implantó en la células Rentro 1 que, aunque son de origen endometrial y por lo tanto de respuesta a estimulación estrogénica, no expresan el gen endógeno que codifica para el RE, por lo tanto eran las candidatas ideales para ser usadas en este estudio.

También es importante mencionar que como tet inhibe la síntesis de proteínas a muy bajas concentraciones, los operones encargados de montar la resistencia están sensibilizados para concentraciones muy por abajo de la inhibitorias, por lo tanto las constantes de unión entre tet y tetTA son altas ($10^9 M^{-1}$), además, el tetTA se une a su operador con muy alta afinidad. Esto permite operar el sistema en dosis de tet varios ordenes de magnitud por abajo de las concentraciones que afectan la tasa de crecimiento y morfología de las células en cultivo¹⁴¹ (Gossen 1993).

Este sistema de regulación ha sido utilizado con éxito en los últimos años por algunos grupos de investigadores, quienes demostraron su eficiencia para regular la expresión de algunas proteínas como las ciclinas D 1 y E en fibroblastos de rata¹⁴² (Resnizky 1994) y en diferentes tipos de líneas celulares humanas como HeLaS3 (carcinoma de células epiteliales) y MCF7 (adenocarcinoma de mama) así como en células ováricas de hámster chino, (AA8)¹⁴³(Yin 1996).

Es importante mencionar que el sistema es dosis-dependiente de tet de tal modo que en las condiciones apropiadas la expresión del gene de interés se puede regular entre 0 y 100% de actividad, es decir se puede “prender” y/o “apagar” el gen.

Hasta ahora no existen evidencias de que este tipo de sistema haya sido utilizado para este fin en células de endometrio, y en este documento mostramos los resultados obtenidos en la generación y caracterización de una línea celular de origen endometrial, la cual fue obtenida después de dos transfecciones estables.

Como se puede ver en la figura 12, la clona RI'-49, resultado de la primera transfección estable con el transactivador de tetraciclina muestra que la administración de tetraciclina al medio de cultivo en un rango de 0 a 1 $\mu\text{g/ml}$, bloquea la acción del transactivador dependiendo de la dosis, alcanzando un 100% de inhibición con la dosis mayor. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por otros autores (Gossen 1992)¹³² en otras líneas celulares, por lo que esta primera clona fue seleccionada para la segunda transfección estable con el pUHD 10-3-HEGO.

La presencia del receptor de todas las clonas estudiadas y la seleccionada, se evaluó inicialmente por su capacidad de inducir la actividad del gen reportero de ERE-CAT en transfecciones transitorias y las que inducían la actividad de la enzima se analizaron por inmunohistoquímica con el anticuerpo monoclonal anti-RE (fig.15) y posteriormente se cuantificó el numero de sitios de unión a la hormona y la constante de disociación del

complejo hormona-receptor (fig. 16).

Como podemos ver en la figura 13, la clona denominada por nosotros RI'-49E1, tiene la capacidad de regular la expresión del RE por la presencia de diferentes dosis de tetraciclina, encontrándose la mayor inhibición con la dosis de 4 $\mu\text{g/ml}$, pero sin llegar al 100%. Esto puede deberse a la presencia del número de moléculas del transactivador en esta clona, por lo que, probablemente, se requieran cantidades mayores de tetraciclina para inactivarlo, o a que este tipo de análisis se realizó en forma indirecta por medio de un tercer plásmido (ERE-CAT), el cual no se encuentra fusionado en forma directa al operador de tetraciclina como en el modelo de Gosseen y Bujard¹³², además que es probable que otros factores esten involucrados en la expresión de la actividad de CAT.

Esta última posibilidad no la podemos descartar ya que en un estudio previo hecho por nuestro grupo¹⁴⁴(García 1997) se demostró que en células RENTO 1, el factor de crecimiento epidérmico (EGF) tiene la capacidad de estimular el gen reportero ERE-CAT, en aparente ausencia de estrógenos y con el gene del RE transfectado transientemente, en forma similar al ejercido por el propio 17 β -estradiol. Asimismo Levenson y cols. en una revisión sobre los efectos de la transfección estable del RE en diversas líneas celulares positivas o negativas para el RE, señala la importancia del contexto celular sobre la actividad de los promotores virales usados en las construcciones de los genes reporteros⁵⁷(Levenson 1994).

Por esta razón pensamos en la necesidad de realizar la medición del número de receptores por medio del análisis de unión hormona-receptor que nos ayudó a evaluar hasta que punto este efecto se debe a que la expresión del receptor no está totalmente inhibida o que la expresión del gen reportero se debe a la presencia de otros factores tanto intrínsecos como extrínsecos de la línea celular. La fig. 16 nos muestra los resultados de este ensayo donde se puede observar que la dosis de tet usada (4 $\mu\text{g/ml}$) inhibe casi de manera total la expresión del RE (450 moléculas/célula), pero no la abate, aunque es probable que para efectos fisiológicos estos niveles de expresión sean insignificantes.

Por otro lado, y como parte de la caracterización de esta línea celular, en términos de proliferación, hicimos algunos experimentos de cuantificación de la proliferación celular, y en forma interesante encontramos que las células RI'-49E1 tienen un patrón de crecimiento mas lento que sus antecesoras (fig. 14). Estos experimentos se hicieron dejando el sistema libre de tetraciclina y en el medio de cultivo habitual para cada línea. Similares resultados fueron demostrados en células HeLa con el RE sobreexpresado¹⁴⁵(Maminta 1991) pero en las cuales no se puede regular la expresión de este receptor.

En relación a los mecanismos involucrados en este proceso de inhibición del crecimiento con el receptor sobreexpresado en presencia de estradiol, aún no se conocen, pero es muy probable que esten involucrados otros genes; tales como myc, fos, jun, u otros factores de crecimiento entre los cuales se encuentra el transformante β (TGF- β), e incluso el posible efecto toxico que esta sobreexpresión pudiera estar ejerciendo en las células.

Por lo anterior creemos que nuestro modelo permitirá en un futuro estudiar estas vías, ya que con el sistema de regulación integrado, podremos hacer experimentos en diferentes condiciones de expresión del RE y estudiar su interacción con otro tipo de genes, por lo que será necesario hacer la detección de algunos marcadores de diferenciación específicos para las células de origen endometrial y estudiar su respuesta diferencial a la estimulación hormonal.

Estudios recientes han tratado de establecer los efectos de la transfección estable del gen del RE en células que expresan el RE endógeno (RE+) como como en otras que no (RE-) y los resultados han sido sorprendentes ya que se ha visto que la estimulación estrogénica inhibe la proliferación en células que carecen de RE endógeno y los antiestrógenos bloquean este efecto, pero en las células que expresan el RE propio no se observó ningún efecto. Wang y sus colaboradores encontraron que la transfección estable del RE silvestre humano y la estimulación con 17β -estradiol disminuía en aproximadamente 60% la proliferación celular y la síntesis de DNA en células MDA-MB 468 (cáncer de mama) que no expresan el RE³⁶(Wang 1997), un efecto similar se vio al transfectar establemente el RE de ratón en una línea de células osteoblasticas de rata (ROS 17/2.8)¹⁴⁶(Migliaccio 1992).

Resultados similares reporta Zajchowski y sus colaboradores cuando transfectaron el RE humano tanto en una línea de células no tumorales inmortalizadas *in vitro* como en MDA-MB- 231, ambas RE- e igualmente muestran que este efecto se revierte con los antiestrógenos y que la introducción estable del RE en la células MCF 7 y T47D (RE+) no tiene ningún efecto¹⁴⁷(Zajchowski 1993). La razón de esto no se conoce, pero se piensa que dado que la expresión del RE propio de la célula es regulada por varios factores como la densidad celular, la tasa de crecimiento, citocinas así como la hormona misma, la transfección de un RE foráneo y su expresión descontrolada pudiera estar activando un mecanismo de retroalimentación negativa que regulara a la baja la expresión del gen endógeno y por lo tanto las células no exhibieran un fenotipo diferente en respuesta a la estimulación estrogénica⁵⁷(Levenson 1994).

Igualmente García en 1992²¹ demostró que el tratamiento con estradiol en células MDA-MB 231 transfectadas establemente con el RE humano tiene este efecto inhibitor en actividad proliferativa y capacidad invasiva cuando probaron con Matrigel. Anteriormente Maminta¹⁴⁵ y sus colaboradores trabajando con células HeLa (carcinoma cervicouterino humano, RE-) habían observado esta inhibición de la proliferación y que este efecto inhibitorio correlacionaba directamente con la cantidad de receptor que se encontraba por célula.

Estas observaciones concuerdan con lo mostrado en la figura 14 donde se puede observar que la clona que expresa establemente el RE muestra una curva de proliferación inferior que cualquiera de sus dos progenitores.

El significado de esta observaciones no es del todo claro, sin embargo aunados a estudios²⁰(Ferguson 1995), que demuestran que la reactivación de la expresión del gen

endógeno que codifica para el RE en la línea MDA-MB 231 (RE-), con el uso de inhibidores de metilación de DNA (5-azacitidina y 2-deoxicitidina), promueve un fenotipo RE+ y una respuesta a tratamiento hormonal pudieran en el futuro significar un potencial terapéutico para los pacientes de cánceres estrógeno dependientes.

Finalmente pensamos que una línea celular como la que hemos desarrollado será de gran utilidad en el estudio del papel que el RE tiene en proliferación celular si el RE foráneo que ha sido transfectado es capaz de ejercer un efecto similar al que lleva acabo en condiciones normales. Sabemos que esta es una limitante a la que tenemos que enfrentarnos por que aunque probablemente este modelo no corresponda a lo que ocurre in vivo en las células, es la única oportunidad con que contamos para estudiar los efectos que los niveles del RE tienen en los mecanismos de proliferación y diferenciación celular sobre todo con respecto a la inducción de protooncogenes e interacción con las rutas de los factores de crecimiento.

6. Referencias bibliograficas.

1. Lachelin GC. Introduction to clinical reproductive endocrinology. Butterwoth-Heinemann. London, 1991.
2. O'Malley B, Strott C. Steroid hormones: metabolism and mechanism of action. In *Reproductive Endocrinology*; Yen S, Yaffe N. (Eds.). 3rd. Edition. WB Saunders Co. USA, 1991.
3. Gore-Langton R, Armstrong D. Follicular steroidogenesis and its control. In: *The Physiology of reproduction*. Knobil E, Neill J. (Eds.) 2nd. Ed. Raven Press, New York 1994.
4. Green B, Leake R. Steroid hormones; A practical approach. IRL Press Oxford Eng, 1987.
5. Guyton A. Tratado de fisiologia medica. 8a. Ed. Interamericana-McGraw-Hill, México, 1992
6. Strauss J, Gurpide E. The endometrium: regulation and dysfunction. In: *Reproductive endocrinology*. Yen S, Jaffe R. (Eds.) WB Saunders Co. USA, 1991.
7. Lau C, Subramaniam M, Rasmussen K, Spelsberg T. Rapid inhibition of the c-jun protooncogene expression in avian oviduct by estrogen. *Endocrinology* 127;2595-97, 1990.
8. Going J, Anderson J, Batterby S, MacIntire A. Proliferation and secretory activity in human breast during natural and artificial menstrual cycles. *Am J Pathol* 130;193-98, 1988.
9. Sar M, Parikh Y. Immunohistochemical localization of estrogen receptor in rat brain, pituitary and uterus with monoclonal antibodies. *J Steroid Biochem* 24;497-503, 1986.
10. Friend K, Ang L, Shupnik M. Estrogen regulates the expression of several different estrogen receptor mRNA isoforms in rat pituitary. *Proc Natl Acad Sci USA* 92;4367-71, 1995.
11. Ciocca D, Vargas-Roig L. Estrogen receptors in non target tissues: biological and clinical implications. *Endocrine Rev.* 16;35-62, 1995.
12. Van de Vijver M, Nusse R. The molecular biology of breast cancer. *Bichem Biophys Acta* 1072;33-50, 1991.
13. Fuqua S, Fitzgerald S, Chamnes G, Tandon A, McDonnell D, Nawaz Z, O'Malley B, McGuire W. Variant human breast tumor estrogen receptor with constitutive transcriptional activity. *Cancer Res* 51;105-09, 1991.
14. Fuqua S, Fitzgerald S, Allred C, Elledge R, Nawaz Z, McDonnell D, O'Malley B, Greene G, McGuire W. Inhibition of estrogen receptor action by a naturally occurring variant in human breast tumors. *Cancer Res* 52; 483-86, 1992.
15. Bergqvist A, Ferno M. Estrogen and progesterone receptors in endometriotic tissue and endometrium : comparison according to localization and recurrence. *Fertil Steril* 60;63-68, 1993.
16. Howell R, Dowsett M, Edmonds K. Oestrogen and progesterone receptor in endometriosis: heterogeneity of different sites. *Hum Reprod* 9;1752-58, 1994.
17. Kholer M, Berkholtz A, Risinger J, Elbendary A, Boyd J, Berchuck A. Mutational analysis of the estrogen-receptor gene in endometrial carcinoma. *Obstet Gynecol* 86; 33-37, 1995.
18. Ma Z, Santagati S, Patrone C, Pollio G, Vegeto E, Maggi A. Insulin -like growth factors activate

estrogen receptor to control the growth and differentiation of the human neuroblastoma cell line SK-ER3. *Mol Endocrinol* 8;910-18, 1994.

19. **Konishi N, Nakaoka S, Hiasa Y, Kitahori Y, Oshima M, Samma S, Okajima E.** Immunohistochemical evaluation of estrogen receptor status in benign prostate hypertrophy and the prostate carcinoma and the relationship to efficacy of endocrine treatment. *Oncology* 50;259-63, 1993.

20. **Ferguson A, Lapidus R, Baylin S, Davidson N.** Demethylation of the estrogen receptor gene in estrogen receptor negative breast cancer cell can reactive estrogen receptor gene expression. *Cancer Res* 55;2279-83, 1995.

21. **Garcia M, Derocq D, Freiss G, Rochefort H.** Activation of estrogen receptor transfected into a receptor-negative breast cancer cell line decreases the metastatic and invasive potential of the cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 89;11538-42, 1992.

22. **Phillips A, Chabos D, Rochefort H.** Estradiol increases and anti-estrogens antagonize the growth factor-induced activator protein-1 activity in MCF7 breast cancer cell without affecting c-fos and c-jun synthesis. *J Biol Chem* 268;14103-08, 1993.

23. **van Agthoven T, Van Agthoven T, Foekens J, Dorssers L.** Regulation of gene expression involved in the progression of human breast cancer to hormone independence. *Ann N Y Acad Sci* 684:250-52, 1993.

24. **Clinton G, Rougeot C, Deracourt J, Roger P, Defrene A, Godyna S, Argraves S, Rochefort H.** Estrogens increase the expression of fibulin-1, an extracellular matrix protein secreted by human ovarian cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 93;316-20, 1996.

25. **Lessey B, Killam A, Metzger D, Hancz F, Greene L, McCarty K.** Immunohistochemical analysis of the human uterine estrogen and progesterone receptor throughout the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 67;334-40, 1988.

26. **Brenner R, Slayden D.** Cyclic changes in the primate oviduct and endometrium. In: *The Physiology of reproduction*. Knobil E, Neill J. (Eds.) 2nd. Ed. Raven Press, New York, 1994.

27. **Ganong W.** *Fisiología Médica*. 11a. Ed. El Manual Moderno, Mexico, 1988.

28. **Freeman M.** The neuroendocrine control of the ovarian cycle in the rat. In: Knobil E, Neill J. (Eds.) *The Physiology of reproduction*. 2nd Ed. Raven Press, New York, 1994.

29. **Henderson B, Rose R, Pike M, Casagrande J.** Endogenous hormones as a major factor in human cancer. *Cancer Res* 43;3232-39, 1982.

30. **Henderson B, Ross R, Bernstein L.** Estrogens as a cause of human cancer: the Richard and Linda Rosenthal foundation award lecture. *Cancer Res* 48;246-53, 1988.

31. **Marchand D.** Risk factors. *Obstet Gynecol Clin North Am* 21;561-86, 1994.

32. **Thomas D.** Do hormones cause breast cancer? *Cancer* 53;595-604, 1984.

33. **Peterson H, Lee N, Rubin G.** Genital neoplasia. In: *Mishell D. (Ed.) Menopause, Physiology and pharmacology*. Year Book Medical Pub. Chicago, 1986.

34. **Assiskis V, Bilimora M, Muenzner H, Lurian J, Craig-Jordan V.** Mutations of the estrogen receptor in endometrial carcinoma: evidence of an association with high tumor grade. *Gynecol Oncol* 63;192-99, 1996.

35. **Kaupila A.** Estrogen and progestin receptors in endometrial cancer and their prognostic relevance. *Acta Oncol* 28;561-66, 1989.
36. **Wang W, Smith R, Burghardt R, Safe H.** 17 β -Estradiol-mediated growth inhibition of MDA-MD- 468 cells stably transfected with the estrogen receptor: cell cycle effects. *Mol Cell Endocrinol* 133; 49-62, 1997.
37. **Alvarado -Duran A.** Etiologia y tratamiento medico de la endometriosis. *Perinat Reprod Hum* 6:82-87, 1992.
38. **Mahmood T, Templeton A.** Prevalence and genesis of endometriosis. *Hum Reprod* 6; 544-49, 1991.
39. **Olive D, Schwartz L.** Endometriosis. *New Engl J Med* 328;1759-69, 1993.
40. **Rock J, Markham S.** Pathogenesis of endometriosis. *Lancet* 340;1264-70, 1992.
41. **Bergvist A, Rannevik G, Thorell J.** Estrogen and progesterone cytosol concentration in endometriotic tissue and intrauterine endometrium. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 79 (101 suppl); 52-8, 1981.
42. **Bergvist A, Carlstrom K, Jeppsson S, Ljungberg O.** Histochemical localization of specific estrogen and progesterone binding in human endometrium and endometriotic tissue. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 123(suppl);15-16, 1984.
43. **Lessey B, Metzger D, Haney A, McCarty K.** Immunohistochemical analysis of estrogen and progesterone receptors in endometriosis: comparison with normal endometrium during the menstrual cycle and the medical therapy. *Fertil Steril* 51;409-14, 1989.
44. **Higuchi T, Narukawa S, Kanzaki H, Fujita J, Iwai M, Mori T.** Expression of messenger ribonucleic acid for gonadal steroid receptors in the human pelvic peritoneum. *Fertil Steril* 63;52-57, 1995.
45. **Prentice A, Randall B, Weddell A, McGill A, Henry L, Horne C, Thomas E.** Ovarian steroid receptor expression in endometriosis and in two potential parent epithelia: endometrium and peritoneal mesothelium. *Hum Reprod* 7;1318-25, 1992.
46. **Jensen EV, Jacobson HI.** Basic guides to the mechanisms of estrogen action. *Recent Prog Horm Res* 18;387-414, 1962.
47. **Gorski J, Toft D, Shyamala G, Smith D, Notides A.** Hormone receptors: studies on the interaction of estrogens with the uterus. *Recent Prog Horm Res* 24;45-80, 1968.
48. **Jensen EV, Susuki T, Kawashima T, Stumpf WE, Jungblut PW, DeSombre ER.** A two step mechanism for the interaction of estradiol with rat uterus. *Proc Natl Acad Sci USA* 59;632-38, 1968.
49. **Katzenellenbogen B.** Dynamics of steroid hormone receptor action. *Annu Rev Physiol* 42;17-25, 1980.
50. **Landers J, Spelsberg T.** New concepts in steroid hormone action: Transcription factors, protooncogenes, and the cascade model for steroid regulation of gene expression. *Crit Rev Eukariot Gene Expr* 2;19-63, 1992.
51. **Schuchard M, Landers J, Punkay N, Spelsberg T.** Steroid hormone regulation of nuclear protooncogenes. *Endocrine Rev* 14;659-69, 1993.
52. **Parker M, Arbuckle N, Dauvois P, Danielian P, White R.** Structure and function of the estrogen

receptor. *Ann N Y Acad Sci* 684;119-26, 1993.

53. **Parker M.** Structure and function of estrogen receptors. *Vitamins and Hormones* 51;267-87, 1995.

54. **Echeverría O, González A, Traish A, Wotiz H, Ubaldo E, Vázquez-Nin G.** Immuno-electron microscopic localization of estradiol receptor in cells of male and female reproductive and non-reproductive organs. *Biol Cell* 81;257-65, 1994.

55. **Greene G, Gilna P, Waterfield M, Baker A, Hart Y, Shine J.** Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA. *Science* 231;1150-54, 1986.

56. **Green S, Walter P, Krust A, Bornet JM, Argos P, Chambon P.** Human estrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. *Nature* 320;134-139, 1986.

57. **Levenson A, Craig Jordan V.** Transfection of human estrogen receptor (ER) cDNA into ER-negative mammalian cell lines. *J Steroid Biochem Molec Biol.* 51;229-39, 1994.

58. **Evans R.** The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 240;889-95, 1988.

59. **Krust A, Green S, Argos P, Kumar V, Bornet JM, Chambon P.** The chicken estrogen receptor sequence: homology to v-erb A and human estrogen and glucocorticoid receptor. *EMBO J* 5;891-97, 1986.

60. **Guichon-Mantel A, Lescop P, Chrstin-Maitre S, Loosfelt H, Perrot-Applanat M, Milgrom E.** Nucleocytoplasmic shuttling of the progesterone receptor. *EMBO J* 10;3851-59, 1991.

61. **Dauvois S, White R, Parker M.** The antiestrogen ICI 182780 disrupts estrogen receptor nucleocytoplasmic shuttling. *J Cell Sci* 106;1377-88, 1993.

62. **Vázquez-Nin G, Echeverría O, Fakan S, Traish A, Wotiz H, Martin T.** Immunoelectron microscopic localization of estrogen receptor on pre-mRNA containing constituents of rat uterine cell nuclei. *Exp Cell Res* 192;396-404, 1991.

63. **Picard D, Kumar V, Chambon P, Yamamoto K.** Signal transduction by steroid hormones. Nuclear localization is differentially regulated in estrogen and glucocorticoid receptors. *Cell Reg* 1;291-99, 1990.

64. **Ylikomi T, Bocquel M, Berry M, Gronenmeyer H, Chambon P.** Cooperation of proto-signals for nuclear accumulation of estrogen and progesterone receptors. *EMBO J* 11;1-14, 1992.

65. **Catelli M, Binart N, Jung T, Renoir J, Baulieu E, Feramisco J, Welch E.** The common 90 Kda protein component of non transformed "8S" steroid receptors is a heat-shock protein. *EMBO J* 4;3131-35, 1985.

66. **Redeuilh G.** Subunit composition of the molybdate stabilised "8-9S" nontransformed estradiol receptor purified from calf uterus. *J Biol Chem* 262;6969-75, 1987.

67. **Pratt W.** Role of heat shock proteins in steroid receptor function. In: *Steroid hormone action.* Parker M (Ed.) IRL Press Oxford, 1993.

68. **Smith D, Toft D.** Steroid receptors and their associated proteins. *Mol Endocrinol* 7;4-11, 1993.

69. **Chambraud B, Berry M, Redeuilh G, Chambon P, Baulieu E.** Several regions of the human estrogen receptor are involved in the formation receptor-heat shock protein 90 complexes. *J Biol Chem* 265;20686-91, 1990.

70. Schlatter L, Howard J, Parker M, Distelhorst C. Comparison of the 90-kiloDalton heat shock protein interaction with in vitro translated glucocorticoid and estrogen receptors. *Mol Endocrinol* 6;132-40, 1992.
71. Katzenellenbogen B, Elliston J, Monsma F, Springer P, Ziegler Y, Greene G. Structural analysis of covalently labeled estrogen receptor by limited proteolysis and monoclonal antibody reactivity. *Biochemistry* 26,2364-73, 1987.
72. Kumar V, Green S, Staub A, Chambon P. Localization of the estradiol-binding and putative DNA-binding domains of the human estrogen receptor. *EMBO J* 5;2231-36, 1989.
73. Fawell S, Lees J, Parker M. A proposed consensus steroid-binding sequence. A reply. *Mol Endocrinol* 3;1002-4, 1989.
74. Danielian P, White R, Hoare S, Fawell S, Parker M. Identification of residues in the estrogen receptor which confer differential sensitivity to estrogen and tamoxifen. *Mol Endocrinol* 7;232-40, 1993.
75. Klein-Hitpass L, Ryffel G, Heitlinger E, Cato A. A 13 bp palindrome is a functional estrogen responsive element and interacts specifically with estrogen receptor. *Nucleic Acid Res.* 16:647.63, 1988.
76. Gorski J, Furlow D, Murdoch F, Fritsch M, Kaneko K, Ying C, Malayer J. Perturbations in the model of estrogen receptor regulation of gene expression. *Biol Reprod.* 48;8-14, 1993.
77. Clark J, Mani S. Actions of steroid hormones. In; *The Physiology of reproduction.* Knobil E, Neill J. (Eds.) 2nd. Ed. Raven Press, New York, 1994.
78. Denton R, Koszewski N, Notides A, Estrogen receptor phosphorylation: hormonal dependence and consequence on DNA binding. *J Biol Chem* 267;7263-68, 1992.
79. Lahooti H, White R, Danielian P, Parker M. Characterization of ligand-dependent phosphorylation of the estrogen receptor. *Mol Endocrinol* 88;182-88, 1994.
80. Le Goff P, Montano M, Schodin D, Katzenellenbogen B. Phosphorylation of the human estrogen receptor: identification of hormone-regulated and examination of their influence on transcriptional activity. *J Biol Chem* 269;4458-66, 1994.
81. Washburn T, Hocutt A, Brautigam D, Korach K. Uterine estrogen receptor in vivo: phosphorylation of nuclear specific forms on serine residues. *Mol Endocrinol* 5;235-42, 1991.
82. Orti E, Bodwell J, Munk A. Phosphorylation of steroid hormone receptors. *Endocrine Rev* 13;105-28, 1992.
83. Kiuper G, Brinkmann A. Steroid hormone receptor phosphorylation: is there a physical role? *Mol Cell Endocrinol* 100;103-07, 1994.
84. Tsay M, O'Malley B. Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annu Rev Biochem* 63;451-86, 1994.
85. Katzenellenbogen B, Miller M, Mullick A, Sheen Y. Antiestrogen action in breast cancer cells: modulation of proliferation and protein synthesis and interaction with estrogen receptor and additional antiestrogen binding sites. *Breast Cancer Res Treat* 5;231-343, 1985.
86. Jordan V, Murphy C. Endocrine pharmacology of antiestrogens as antitumor agents. *Endocrine Res*

87. **Katzenellenbogen B, Montano M, Le Goff P, Schodin D, Lee Kraus W, Bhardwaj B, Fujimoto N.** Antiestrogens: Mechanism and actions in target cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 56;387-93, 1995.
88. **Metzger D, Ali S, Bornert J, Chambon P.** Characterization of the amino terminal transcriptional activation function of the human estrogen receptor in animal and yeast cells. *J Biol Chem* 270; 9535-42, 1995.
89. **Fawell S, White R, Hoare S, Sideham Page M, Parker M.** Inhibition of estrogen receptor-DNA binding by the pure antiestrogen ICI 164,384 appears to be mediated by impaired receptor dimerization. *Proc Natl Acad Sci USA* 87;6883-87, 1990.
90. **McDonnell D, Dana S, Hoener P, Lieberman B, Imhof M, Stein R.** Cellular mechanisms which distinguish between hormone and antihormone activated estrogen receptor. *Ann New York Acad Sci* 761;121-37, 1995.
91. **Aronica S, Kraus W, Katzenellenbogen B.** Estrogen action via the cAMP signaling pathway: Stimulation of adenylate cyclase and cAMP-regulated gene transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* 91;8517-21, 1994
92. **El-Tanai M, Green C.** Interaction between estradiol and AMPc in the regulation of specific gene expression. *Mol Cell Endocrinol* 124;71-77, 1996.
93. **Power R, Mani S, Codina J, Conneely O, O'malley B.** Dopaminergic and ligand-independent activation of steroid hormone receptors. *Science* 254; 1636-39, 1991.
94. **O'Malley B, Schader W, Mani S, Smith C, Weigel N, Conneely O, Clark J.** An alternative ligand-independent pathway for activation of steroid receptor. *Rec Prog Horm Res* 50;333-47, 1995.
95. **Hyder S, Stancel G, Loose-Mitchell D.** Steroid hormone-induced expression of oncogene encoded nuclear proteins. *Crit Rev Eukariotic Gene Expression* 4;55-116, 1994.
96. **Bhattacharyya N, Ramsammy R, Eatman E, Hollis V, Anderson W.** Protooncogene, growth factor receptor, and estrogen and progesterone receptor gene expression in the immature rat uterus after treatment with estrogen and tamoxifen. *J Submicrosc Cytol Pathol* 26;147-62, 1994.
97. **Angel P, Karin M.** The role of jun, fos and the AP-1 complex in cell proliferation and transformation. *Biochem Biophys Acta* 1072;129-57, 1991.
98. **Doucas V, Spirou G, Yaniv M.** Unregulated expression of c-jun or c-fos protein but not jun-D inhibits oestrogen receptor activity in human breast cancer derived cells. *EMBO J* 10;2237-45, 1991.
99. **Miner J, Yamamoto K.** Regulatory cross-talk at composite response elements. *TIBS* 16; 423-26, 1991.
100. **Diamond M; Miner J, Yoshinaga S, Yamamoto K.** Transcription factor interactions: selectors of positive or negative regulation from a single DNA element. *Science* 249;1260-72, 1990.
101. **Jonat C, Rahmsdorf H, Park K, Cato A, Gebel S, Ponta H, Herrlich P.** Antitumor promotion and antiinflammation: down-modulation of AP-1 (fos-jun) activity by glucocorticoid hormone. *Cell* 62;1189-1204, 1990.

102. **Gaub M, Bellard M, Scheurer Y, Chambon P, Sassone-Corsi P.** Activation of The ovalbumin gene by the estrogen receptor involves the fos-jun complex. *Cell* 63;1267-76, 1990.
103. **Yang-Yen H, Chambard J, Sun Y, Schmidt T, Drouin J, Karin M.** Transcriptional interference between c-jun and glucocorticoid receptor: mutual inhibition of DNA binding due to direct protein-protein interaction. *Cell* 62;1205-15, 1990.
104. **Travers M, Knowler J.** Oestrogen-induced expression of oncogenes in the immature rat uterus. *FEBS Lett* 1987; 211:27-30
105. **Murphy L, Murphy L, Friesen H.** Estrogen induction of n-myc and c-myc proto-oncogene expression in the rat uterus. *Endocrinology* 120;1882-88, 1987.
106. **Weisz A, Bresciani F.** Estrogen induces expression of c-fos and c-myc protooncogenes in rat uterus. *Mol Endocrinol.* 2;816-24, 1988.
107. **Chiappetta C, Stancel G, Loose-Mitchell D.** Estrogen-induced regulation of c-jun messenger ribonucleic acid in vivo. *J Cell Biol.* 1990;109:119a.
108. **van der Burg B, van Selm-Miltenburg A, de Laat S, van Zoelen E.** Direct effects of estrogen on c-fos and c-myc protooncogene expression and cellular proliferation in human breast cancer cells. *Mol Cell Endocrinol* 64;223-28, 1989.
109. **Webb D, Moulton B, Khan S.** Estrogen induces expression of c-jun and jun-B protooncogenes in specific rat uterine cells. *Endocrinology* 133;20-28, 1993.
110. **Weisz A, Cicatiello L, Persico E, Scalona M, Bresciani F.** Estrogen stimulates transcription of c-jun protooncogene. *Mol Endocrinol* 4;1041-50, 1990.
111. **Persico E, Scalona M, Cicatiello L, Sica V, Bresciani F, Wiesz A.** Activation of 'immediate early' gene by estrogen is not sufficient to achieve stimulation of DNA synthesis in rat uterus. *Biochem Biophys Res Commun* 171;287-92, 1990.
112. **Cohrs R, Goswami B, Sharma O.** Down regulation of c-myc , c-fos and erb-B during estrogen induced proliferation of thr chick oviduct. *Biochem Biophys Res Commun* 150;82-88, 1988.
113. **Loose-Mitchell D, Chiappetta C, Stancel G.** Estrogen regulation of c-fos messenger ribonucleic acid. *Mol Endocrinol* 2;946-51, 1988.
114. **Nelson K, Takayashi T, Bossert N, Walmer D, McLachan J.** Epidermal growth factor replaces estrogen in the stimulation of female genital-tract growth and differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 88;21-25, 1991.
115. **Ignar-Trowbridge D, Nelson K, Bidwell M, Curtis S, Washburn T, McLachlan J, Korach K.** Coupling of dual signaling pathways: Epidermal growth factor action involves the estrogen receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 89;4658-62, 1992.
116. **Ignar-Trowbridge D, Teng C, Ross K, Parker M, Korach K, McLachlan J.** Peptide growth factors elicit estrogen receptor-dependent transcriptional activation of an estrogen-responsive element. *Molec Endocrinol* 7;992-98, 1993.
117. **Ignar-Trowbridge D, Pimentel M, Parker M, McLachlan J, Korach K.** Peptide growth factor cross-talk

with the estrogen receptor requires the A/B domains and occurs independently of protein kinase C or estradiol. *Endocrinology* 137;1735-44, 1996.

118. **Chalbos D, Philips A, Rochefort H.** Genomic cross-talk between the estrogen receptor and growth factor regulatory pathways in estrogen target tissues. *Semin Cancer Biol* 5;361-68, 1994.

119. **Mouihate A, Lestage J.** Estrogen increases the release of epidermal growth factor from individual pituitary cells in female rats. *J Endocrinol* 146;495-500, 1995.

120. **Huynh H, Pollak M.** Insulin-like growth factor-I gene expression in the uterus is stimulated by tamoxifen and inhibited by the pure antiestrogen ICI 182780. *Cancer Res* 53; 5585-88, 1993.

121. **Newton C, Buric R, Trapp T, Brockmeier S, Pagotto U, Stalla G.** The unligated estrogen receptor (ER) transduces growth factors signals. *J Steroid Biochem Molec Biol* 48;481-86, 1994

122. **Mukku VR, Stancel G.** Regulation of epidermal growth factor receptor by estrogen. *J Biol Chem* 260;9820-24, 1985.

123. **Lingham R, Stancel G, Loose-Mitchell D.** Estrogen induction of epidermal growth factor receptor mRNA. *Mol Endocrinol* 2;230-35, 1988.

124. **Tomooka Y, DiAugustine P, McLachan A.** Proliferation of mouse uterine epithelial cells in vitro. *Endocrinology* 118;1011-18, 1986.

125. **Sumida C, Pasqualini R.** Antiestrogens antagonize the stimulatory effect of epidermal growth factor on the induction of progesterone receptor in fetal uterine cells in culture. *Endocrinology* 124;591-97, 1989.

126. **Barrón A, Bermejo L, Castro I.** Estructura y función del receptor de estrógenos: Un enfoque particular hacia la glándula mamaria. *Rev Inv Clin* (en prensa).

127. **Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson J.** *Molecular Biology of The Cell*. 3rd. Ed. Garland Publishing Inc. USA, 1994.

128. **Reid L, Jefferson D.** Cell culture studies using extracts of extracellular matrix to study growth and differentiation in mammalian cells. In; Mather JP.(Ed.) *Mammalian cell culture. The use of serum free hormone-supplemented media*. Plenum Press. New York, 1984.

129. **Adams R.** *Cell culture for biochemist*. In; Burdon R, Knippenberg P. (Eds.) *Laboratory techniques in Biochemistry and Molecular Biology*. Elsevier. Amsterdam, 1990.

130. **Echeverría O, Vazquez-Nin G, Pedron J.** A rapid method for the isolation and culture of endometrial epithelial cells in response to estradiol. *Acta Anat* 106;45-56, 1980.

131. **Wiele R, Helftenbein G, Land H, Neumann K, Beato M.** Establishment of rat endometrial cell lines by retroviral mediated transfer of immortalizing and transforming oncogenes. *Oncogene* 5;787-794, 1990.

132. **Gossen M, Bujard H.** Tight control of gene expression in mammalian cell by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci USA* 89;5547-51, 1992.

133. **Hillen W, Gatz C, Altschmied L, Schollmeier K, Meyer Y.** Control expression of the Tn10-encoded tetracycline resistance genes. *J Mol Biol* 169;707-721, 1983.

134. **Hinrichs W, Kisker C, Duvel M, Muller A, Tovar K, Hillen W, Saenger w.** Structure of the tet

repressor-tetracycline complex and regulation of antibiotic resistance. *Science* 264; 418-20. 1994.

135. Ausubel F, Brent R, Kingston R, Moore D, Seidman J, Smith J, Struhl K. *Current Protocols in Molecular Biology*. Harvard Medical School, John Wiley and sons Inc. USA, 1997.

136. Brasier A, Ron D. Luciferase reporter gene assay in mammalian cells. *Methods Enzimol* 216;386-97, 1992.

137. Deuschle U, Peperkok R, Wang F, Giordano T, McAllister W, Ansorge W, Bujard H. Regulated expression of foreign genes in mammalian cells under the control of coliphage T3 RNA polymerase and Lac repressor. *Proc Natl Acad Sci USA* 80;5400-5404, 1989.

138. Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. *Molecular cloning. Laboratory manual*. 2nd Ed. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York, 1989.

139. *Receptor binding Techniques*. 1980 Short Course Syllabus. Society for Neuroscience, Ohio, USA, 1980.

140. Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72;248-54, 1976.

141. Gossen M, Bonin A, Bujard H. Control of gene activity in higher eukaryotic cells by prokaryotic regulatory elements. *TIBS* 18;471-75, 1993.

142. Resnitzky D, Gossen M, Bujard H, Reed S. Acceleration of the G1/S phase transition by expression of cyclins D1 and E with an inducible system. *Molec Cell Biol* 14;1669-79, 1994.

143. Yin D, Zhu L, Schimke R. Tetracycline-controlled gene expression system achieves high-level and quantitative control of gene expression. *Anal Biochem* 235;195-201, 1996.

144. García M. Efecto del factor de crecimiento epidérmico (EGF) sobre la proliferación de células endometriales de rata en cultivo. Tesis de licenciatura. Universidad Iberoamericana. 1997.

145. Maminta M, Molteni A, Rosen S. Stable expression of the human estrogen receptor in HeLa cells by infection: effect of estrogen on cells proliferation and c-myc expression. *Mol Cell Endocrinol* 78;61-69, 1991.

146. Migliaccio S, Davis V, Gibson M, Gray T, Korach K. Estrogens modulate the responsiveness of osteoblast-like cells (ROS 17/2.8) stably transfected with estrogen receptor. *Endocrinology* 130;2617-24, 1992.

147. Zajchowski D, Sager R, Webster L. Estrogen inhibits the growth of estrogen receptor negative, but not estrogen receptor positive, human mammary epithelial cells expressing a recombinant estrogen receptor. *Cancer Res* 53;5004-11, 1993.