

00387



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

"ESTUDIO DEL EFECTO DE LA EXPRESIÓN DEL RECEPTOR
DE ESTRÓGENOS SOBRE LA PROLIFERACIÓN *IN VITRO* DE
LA LÍNEA DE CÁNCER DE MAMA MDA-MB 231".

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A :

M. en C. ARTURO BARRÓN GONZÁLEZ.

DIRECTOR DE TESIS: DRA. JULIETA IVONE CASTRO ROMERO

MÉXICO, D. F.

MAYO, 2004



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS COORDINACIÓN

Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 15 de marzo del 2004, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado del Doctorado en Ciencias del alumno(a) **Arturo Barrón González**, con número de cuenta 73030595 y número de expediente 3921102, con la tesis titulada: **"Estudio del efecto de la expresión del receptor de estrógenos sobre la proliferación in vitro de la línea del cáncer de mama MDA-MB 231"**, bajo la dirección del (la) **Dra. Julieta Ivone Castro Romero**.

Presidente:	Dr. Ignacio Camacho Arroyo
Vocal:	Dra. María Genoveva González Morán
Vocal:	Dra. María Eugenia Torres Márquez
Vocal:	Dr. Edelmiro Santiago Osorio
Secretario:	Dra. Julieta Ivone Castro Romero
Suplente:	Dr. Luis Felipe Jiménez García
Suplente:	Dr. Emilio Rojas del Castillo

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 07 de mayo de 2004

Dr. Juan José Morrone Lupi
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del interesado

Este trabajo de tesis pertenece al proyecto de Investigación del Instituto Nacional de Perinatología titulado “Estudio del efecto de la expresión del receptor de estrógenos sobre la proliferación in vitro y capacidad tumorigénica in vivo de las células de cáncer de mama MDA-MB 231” con número de registro 212250-19281 y fue realizado en las instalaciones y con financiamiento del mismo Instituto.

El presente trabajo de tesis se realizó con el apoyo económico del Consejo nacional de Ciencia y Tecnología (Beca-crédito para estudios de doctorado)

Comité Tutorial bajo cuya supervisión se realizo este trabajo.

**- Dra. Julieta Ivone Castro Romero.
Jefe del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular.
Instituto Nacional de Perinatología.**

**- Dr. Ignacio Camacho Arroyo.
Departamento de Biología.
Facultad de Química, UNAM.**

**- Dr. Emilio Rojas Del Castillo.
Departamento de Genética Toxicológica.
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.**

ÍNDICE GENERAL.	Página
I. Resumen en español	6
II. Resumen en inglés	7
III. Introducción	8
IV. Objetivos	30
V. Metodología	31
V. Resultados	42
VI. Discusión	53
VII. Conclusiones	60
VIII. Referencias	61
VIII. Anexo I: Sistema de regulación de la Expresión genética de Goosen y Bujard	76

ÍNDICE DE FIGURAS.	Página
Figura 1. Estructura Química de los estrógenos.	8
Figura 2. Estructura y organización funcional del receptor de estrógenos α .	12
Figura 3. Modelo propuesto para el mecanismo de acción de los estrógenos.	17
Figura 4. Patrón de restricción de pTRE-HEGO	33
Figura 5. Actividad de LUC en clona MDA-A4	42
Figura 6. Curva de regulación de CAT en clona MDA-A4-5/2.	43
Figura 7. Curvas de saturación por competencia de unión hormona-receptor.	45
Figura 8. Cinética de proliferación celular.	46
Figura 9. Panel de gráficas correspondientes a la fase de estandarización de los registros de citometría.	48
Figura 10. Panel de histogramas de ciclo celular. Estimulación: medio normal.	49
Figura 11. Panel de Histogramas de ciclo celular. Estimulación: E_2 .	49
Figura 12. Panel de histogramas de ciclo celular. Estimulación: E_2 + ICI 182,780.	50
Figura 13. Panel de histogramas de ciclo celular. Estimulación: E_2 + TAM.	50
Figura 14. Panel de histogramas de ciclo celular. Estimulación: E_2 + DOX.	50
Figura 15. Panel de histogramas de ciclo celular. Estimulación: Vehículo.	50
Figura 16. Electroforesis de los productos de RT-PCR para el gen del receptor de progesterona.	52

ÍNDICE DE TABLAS

Página

Tabla 1. Esquema de tratamiento
aplicado a la clona MDA-A4-5/2

38

Tabla 2. Valores de las curvas de proliferación
de la clona MDA-A4-5/2

47

Tabla 3. Porcentaje de células en fase "S"
clona MDA-A4-5/2

51

Resumen.

Los estrógenos (E_2) son hormonas esteroides esenciales para el crecimiento y desarrollo de la glándula mamaria normal y para la mayoría de los cánceres de mama. Ejercen sus efectos genómicos a través del receptor de estrógenos (RE), un factor de transcripción inducible por ligando. Se conocen dos tipos de tumores mamarios, los que expresan el RE (RE+) y los que no (RE-); los últimos presentan un fenotipo más proliferativo e invasivo. Con el objetivo de establecer si la re-expresión del RE α pudiera recrear el fenotipo hormono-dependiente y regular la proliferación celular, nos propusimos desarrollar una línea celular de cáncer de mama que nos permitiera establecer si en condiciones de re-expresión del RE α , la estimulación estrogénica induce la disminución de la proliferación celular. Usamos la línea de cáncer de mama humano MDA-MB 231(RE α -) para transfectarle de manera estable el gen que codifica para RE α , usando el sistema de regulación de la expresión genética dependiente de tetraciclina de Gossen y Bujard (Tet-Off System). Denominamos esta línea MDA-A4-5/2 y en ella, la expresión del RE α es regulada de forma dosis-dependiente de doxiciclina, se traduce de manera similar a como lo hace el receptor endógeno, con afinidad por el ligando y capacidad de unión a elementos de respuesta a estrógenos como se observa por la activación de genes reporteros. En esta línea celular demostramos, tanto por cuenta celular, como por fracción celular en fase "S", que la estimulación estrogénica efectivamente induce una disminución significativa de la proliferación en condiciones de re-expresión del RE α , y que este efecto es mediado por el receptor, ya que los antiestrógenos tamoxifen e ICI 182,780 bloquean esta inhibición. Cuando evaluamos la expresión del gen endógeno de progesterona observamos una correlación positiva entre la expresión de ambos receptores. Nuestros resultados sugieren que la re-expresión del RE α en líneas celulares de cáncer de mama RE negativa recrean, al menos parcialmente, un fenotipo hormono-dependiente y esto pudiera ser de futura utilidad en el tratamiento de esta patología.

Abstract.

Estrogens (E_2) are essential for the growth of normal breast and most estrogen receptor (ER) positive breast carcinomas. ER-negative breast carcinomas are often difficult to treat. In an attempt to determine if expressing the human $ER\alpha$ in an ectopic manner could restore the hormone responsiveness and modulate the cell growth, we have expressed the human wild type $ER\alpha$ in ER-negative breast cancer cell line MDA-MB 231 using a tetracycline-regulated expression system. In this cell line, named MDA-A4-5/2, the $ER\alpha$ expression was regulated by doxycycline in dose-dependent fashion. The $ER\alpha$ was correctly translated, had an appropriately hormone binding affinity and bound well to estrogen response element containing DNA. Estradiol treatment of $ER\alpha$ containing cells suppressed proliferation of the cells, as demonstrated by direct cell count as well as by flow cytometry S-phase fraction, while the pure antiestrogen ICI 182,780 and the partial antiestrogen tamoxifen blocked this effect. We examined endogenous progesterone receptor (PR) gene expression in MDA-A4-5/2 cells by RT-PCR amplification and showed PR expression only in $ER\alpha$ expression conditions. These results suggest that the re-expression of the $ER\alpha$ in ER-negative breast cancer cells recreate, at least partially, a hormone-responsive phenotype. The ability of E_2 to suppress the proliferation of $ER\alpha$ -negative breast cancer cells that re-express ER might be useful as a therapy approach for controlling the growth of ER-negative breast cancer cells.

Introducción.

1. Estrógenos: Definición y estructura.

El término estrógenos (E_2) es una denominación genérica que incluye algunas de las hormonas sexuales femeninas secretadas por los ovarios, 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 17β -estradiol (estra-1,3,5[10]-triene-3,17 β -diol) y la estrona (3-hidroxi-estra-1,3,5[10]-trien-17-ona).

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 17β -estradiol, respectivamente, por un complejo enzimático localizado en la membrana del retículo endoplásmico liso. Este complejo 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 metilo del C-10, liberado como ácido fórmico, seguido de un rearrreglo del anillo A para originar una estructura aromática. La reacción requiere de NADPH y O_2 molecular (Gore-Langton 1994).

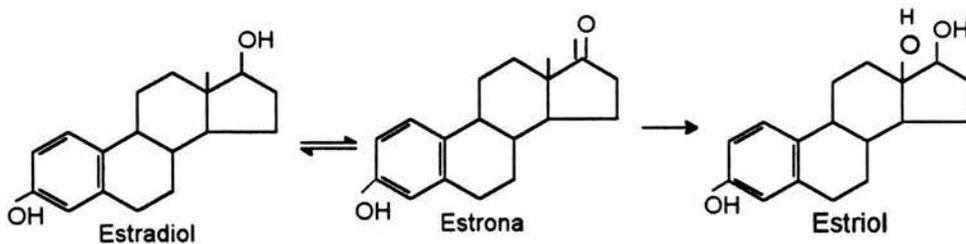


Figura 1. Estructura química de los estrógenos.

2. 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 luteinizante (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 esteroides.

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. 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.

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.

(O'Malley 1991, Gore-Langton 1994).

3. Estructura del receptor de estrógenos (RE):

Los E_2 ejercen sus efectos a nivel genómico a través de un receptor específico, que se une directamente a secuencias específicas de DNA, conocidas como elementos de respuesta a estrógenos (ERE), y en forma indirecta, junto con otros factores de transcripción (complejos AP-1), a los sitios AP-1 y activa la transcripción de los genes estrógeno-dependientes (**Parker 1993, Parker 1995, Enmark 1999**).

La estructura funcional del RE es la que le permite actuar como un transductor de la señal hormonal ya que contiene regiones específicas; en el extremo N terminal se encuentra el dominio de activación transcripcional 1 (TAF-1), que es independiente de ligando, y el dominio de unión a DNA (DBD) que presenta dos "dedos de zinc" a través de los cuales se une a los ERE's en el DNA. Hacia el extremo C terminal se encuentra el dominio de activación transcripcional 2 (TAF-2), que es dependiente de la unión del ligando, y el dominio de unión a la hormona (HBD) por medio del cual el RE reconoce y se une a la hormona natural ó con sus diversos ligandos; el RE se une a las secuencias consenso en DNA en forma de dímero (**Parker 1993, Parker 1995, Iwase 1998, Beato 2000, Landers 1992, Barrón 1997**).

Se conocen dos formas nucleares del RE humano, la forma α (RE α) que fue clonada y secuenciada a partir de células MCF 7 (cáncer de mama humano) (**Green 1986, Greene 1986**) y la forma β (RE β) identificada posteriormente a partir de una genoteca de expresión de testículo humano (**Mosselman 1996**). El gen del RE α está localizado en el cromosoma 6q25.1 (**Menasce 1993**) y el del β en el cromosoma 14q22-24 (**Enmark 1997**). El primero codifica para una proteína de 65 KDa (595 aminoácidos, aa) y se expresa principalmente en mama, útero, hipotálamo, hipófisis y ovario. El segundo codifica para dos isoformas, una de 55 KDa (485 aa.) y otra de 60 KDa (530 aa) (**Enmark 1997, Moore 1998, Ogawa 1998**), las cuales se expresan principalmente en riñón, timo, pulmón, bazo,

hipotálamo, hipófisis, próstata, testículo, ovario, sistema digestivo, vejiga, y glándula mamaria (**Enmark 1997**). Ambas formas pueden coexistir en el mismo tejido y en las mismas células e incluso algunos resultados experimentales sugieren la posibilidad de que se formen heterodímeros funcionales entre ellas (**Peterson 1997, Hall 1999**).

Se sabe que ambas formas presentan 96% de homología en el DBD y 53% en el HBD, pero en total solo comparten 45% de homología y contienen la misma regionalización funcional, (**Ogawa 1998, Gustafsson 2000, Enmark 1997**).

Asimismo se han identificado por inmunohistoquímica algunas formas transmembranales del RE α endógeno en células MCF7 (cáncer de mama humano) (**Powell 2001**), es evidente que la existencia de un RE membranar explicaría los efectos inmediatos de los E₂ en algunos tejidos. Por otro lado cuando se transfectó establemente, en células CHO (ovario de hamster Chino), el DNA complementario (DNAC) tanto de la forma α como de la β , se observó que los receptores de ambos compartimentos celulares (nuclear y membranar) se originan del mismo transcrito y presentan constantes de disociación (Kd) similares, pero la forma membranar solo representa una pequeña proporción (3%) de la expresión de la forma nuclear (**Razandi 1999**). A pesar de que no existen evidencias decisivas sobre la existencia de un RE transmembranar, si existe un creciente cuerpo de evidencia experimental que indica que los E₂ pueden iniciar cascadas de señalización intracelular desde el exterior de la célula y pueden, de hecho, utilizar las vías de transducción de señales comúnmente empleadas por otras moléculas de señalización extracelular como los factores de crecimiento (**Coleman 2001**).

El RE α como todos los otros receptores hormonales, 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 "bisagra" (D); y los exones 5-8

codifican para la región de unión del receptor al esteroide (E-F) (**Fig. 2**). 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 esta proteína (**Krust 1986**).

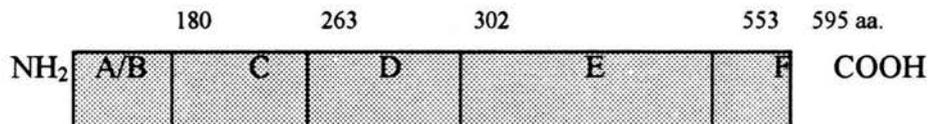


Figura 2. Estructura y organización funcional del RE α . el dominio A/B contiene la función de activación de la transcripción 1 (TAF 1) que es independiente de la unión del ligando, el dominio C la región de unión a DNA (DBD); entre la región C y D se encuentra la señal de localización nuclear (NLS). 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, en el extremo C terminal juega un papel regulador de la actividad transcripcional de receptor. (Adaptado de; **Tsay 1994, Parker 1995, Montano 1995**).

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 ión de este elemento unido a 4 residuos de cisteína para formar la estructura proteica que más comúnmente interactúa con secuencias de DNA (**O'Malley 1991**).

Los RE's se encuentran localizados principalmente en el núcleo, independientemente si están o no unidos a su ligando, sin embargo, existen algunas evidencias que señalan que a pesar de que también se encuentra en el citoplasma, éste se transporta rápidamente al núcleo por un mecanismo dependiente de energía (**Guichon-Mantel 1991, Dauvois 1993**). 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 (**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 (heat-shock protein) (**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 hsp90 (**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 nuclear (**Smith 1993**). **Chambraud (1990) y Schlatter (1992)** 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 aa. Este sitio ha sido bien caracterizado por diferentes investigadores (**Katzenellenbogen 1987, Kumar 1986, Fawell 1990**) 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 (**Danielian 1993**).

El complejo activado RE-E₂ se une en forma de homodímero o heterodímero 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 localizado en la región promotora del gen de vitelogenina A2 de *Xenopus laevis* y corresponde a la secuencia GGTCACAGTGACC; anteriormente ya se había identificado la presencia de este palíndromo en promotor de varios genes regulados por estrógenos (**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 si es importante su presencia física por que se ha determinado que el receptor a

hormona tiroidea tiene la misma secuencia externa pero solo hay una base interna, es decir, N=1 (O'Malley 1991).

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 (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 el grupo de 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 (Orti 1992, Kiuper 1994); por otro lado, se ha visto que algunos factores que actúan en forma independiente a los esteroides (Vg. factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento similar a la insulina I) son capaces de inducir la fosforilación y activación del RE a través de señales que generan una cascada de eventos de fosforilación (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 receptores (Kiuper 1994).

4. Acciones de los estrógenos.

Las acciones de los E₂ en general se relacionan con la reproducción y el comportamiento sexual de los mamíferos y contribuyen al éxito de los procesos reproductivos a diferentes niveles, Actúan sobre los centros del sistema nervioso central que controlan el comportamiento sexual y permiten el coito en el momento en que los ovocitos maduros son liberados de los folículos. También favorecen el transporte de los ovocitos y los espermatozoides para que se lleve a cabo la fecundación y determinan los cambios uterinos que se requieren para la

implantación, el desarrollo embrionario, la gestación y el parto (**Gore-Langton 1994**) y en la glándula mamaria provocan el aumento del estroma, el desarrollo del sistema de ductos y los depósitos de grasa (**Guyton 1992**).

Todas estas acciones la llevan a cabo los E₂ al regular la proliferación celular, el crecimiento, diferenciación y fisiología de muchos tejidos conocidos como de "respuesta estrogénica"; entre los que se incluye; el útero (**Strauss 1991**), oviducto (**Lau 1990**), la glándula mamaria (**Going 1988**), hipotálamo (**Sar 1986**) e hipófisis (**Friend 1995**).

Asimismo en tejido óseo estos esteroides ejercen un papel importante en su mantenimiento y se ha demostrado su importancia en la fisiología de otros tejidos como el hígado (**Lachelin 1991, Ciocca 1995**) así como el hecho de gran importancia clínica de su participación en la aparición y mantenimiento de algunos tumores derivados de mama (**van de Vijver 1991, Fuqua 1991, Fuqua 1992**), útero (**Bergvist 1993, Howell 1994, Kohler 1995, Ma 1994,**) y de próstata (**Konishi 1993**), y en líneas celulares derivadas de estos tejidos (**Ferguson 1995, Garcia 1992, Phillips 1993, van agthoven 1993**), así como de ovario (**Clinton 1996**).

La estimulación estrogénica induce la síntesis de somatomedinas como el factor de crecimiento similar a insulina 1 (IGF-1) (**Huynh 1993**), factor de crecimiento transformante α y β (TGF α y β) (**Arrick 1990**), factor de crecimiento epidérmico (EGF) (**Mouihate 1995**) y su receptor (EGFr) (**Lingham 1988**), también incrementa la expresión de los protooncogenes c-myc (**Murphy 1987**), c-fos (**Hyder 1991**) y c-jun (**Hyder 1995**) involucrados en la regulación de la expresión genética y la síntesis de DNA (**Strauss 1991**).

5. Mecanismo de acción estrogénica.

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 especificidad (**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 (**Jensen 1968, Gorski 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 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 el RE, que se encuentra 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, y se asocia con la fosforilación en residuos aminoácidos específicos y cambios conformacionales que le permiten unirse a sitios específicos en DNA, conocidos como elementos de respuesta a estrógenos (ERE's), y de actuar como un activador o modulador transcripcional (**Katzenellenbogen 1980, Landers 1992**).

Este modelo se ha ido modificando de acuerdo a los hallazgos experimentales y cada vez se complica mas la visión de los mecanismos de acción de la estimulación estrogénica, ahora se sabe que la acción de los estrógenos se lleva a cabo ejerciendo su efecto transcripcional inicial sobre genes de respuesta temprana que codifican para proteínas reguladoras (como los protooncogenes myc, fos y jun) que actúan como estaciones de relevo para la acción hormonal y que a su vez activan transcripcionalmente a otros genes estructurales,

responsables del cambio fenotípico en las células, aparte del efecto directo que los E₂ presentan sobre genes estructurales. (Fig. 3).

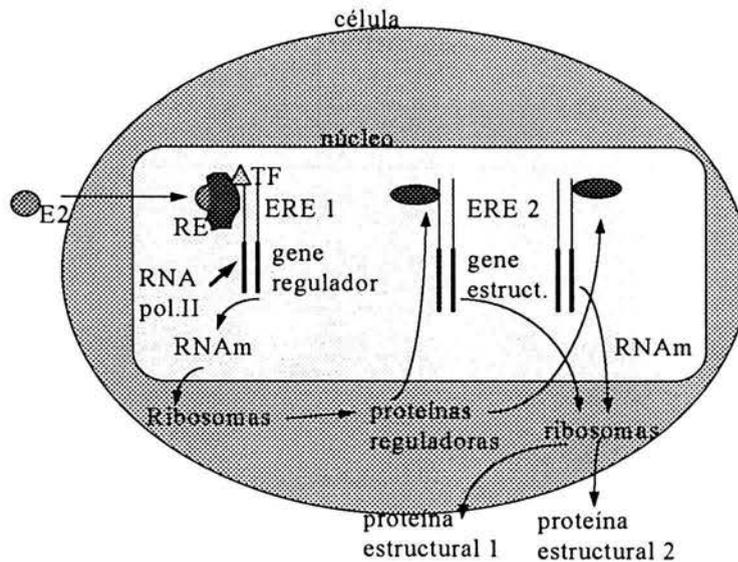


Figura 3. Modelo propuesto para el mecanismo de acción de los estrógenos. E₂= estrógenos, RE= receptor de estrógenos, ERE= elemento de respuesta a estrógenos, TF= factores de Transcripción. (Adaptado de Landers 1992)

Con base a las nuevas evidencias de la investigación en este campo, es claro que esta es una visión simplificada de los eventos biológicos que dirigen, controlan y regulan la expresión genética de una célula 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 ha llevado a muchos grupos científicos a la búsqueda de nuevos conocimientos para entender los mecanismos y las vías involucradas en la acción de estos esteroides. A la fecha existen múltiples estudios cuyos hallazgos involucran básicamente tres rutas de regulación y señalización celular; i) la de adenilato ciclasa (AMPc), ii) la de los protooncogenes nucleares, principalmente fos, myc y jun, y iii) la de los factores de crecimiento particularmente el EGF y el IGF-I.

6. Cáncer de mama.

El cáncer de mama es un tumor maligno que se desarrolla de las células de la mama, ocurre principalmente en mujeres pero también ocasionalmente en hombres. El tipo general de cáncer de mama es el adenocarcinoma, que tiene origen en el epitelio glandular de la mama y presenta dos clases principales; el carcinoma ductal que, como su nombre lo indica, se origina en los ductos de paso de la leche y representa aproximadamente el 80% de todos los casos de cáncer de mama, y el carcinoma lobular, originado en los lóbulos productores de leche, que representa aproximadamente el 15-20% de los casos (**American Cancer Society 2000**).

Con excepción del cáncer de piel no-melanoma, el cáncer de mama es la malignidad celular más comúnmente diagnosticada en las mujeres. En el mundo entero, para el año 2000, se registraron 1 050,346 nuevos casos de cáncer de mama y 372,969 muertes. En México, para el mismo periodo, se registraron 15,063 nuevos casos y 4,716 muertes. Asimismo se estima que para el año 2001 alrededor de 1.2 millones de personas fueron diagnosticadas con este tipo de cáncer en todo el mundo (**International Agency for Research on Cancer, iarc 2001**).

La Sociedad Americana de Cáncer estima que en 2001 serán diagnosticados en los Estados Unidos, aproximadamente, 192,200 nuevos casos de cáncer de mama invasivo en mujeres, así como 1500 casos en hombres y solo el cáncer de pulmón presentará una mortalidad mayor, si consideramos que 40,800 mujeres pueden morir por cáncer de mama para el mismo periodo y país. Desde 1990 las tasas de incidencia ajustadas por edad para Estados Unidos se han mantenido estables en aproximadamente 110 casos por 100,000 mujeres/año (**American Cancer Society 2000, Alberg 2000**). El cáncer de mama es, además, el cáncer fatal más comúnmente diagnosticado en la unión europea (**Hill 1997**).

Estos datos implican que el cáncer de mama es uno de los principales problemas de salud del mundo y desafortunadamente en la actualidad no se conocen los mecanismos moleculares y celulares que están involucrados en el desarrollo de tumores malignos y únicamente se han identificado algunos factores de riesgo que se asocian con esta enfermedad.

Un factor de riesgo es cualquier cosa, circunstancia, actividad, actitud y/o disposición genética que incrementa la probabilidad de un individuo de contraer una enfermedad, pero el hecho que una persona presente uno o varios factores de riesgo no significa, necesariamente, que esa persona contraerá la enfermedad. Incluso cuando una mujer que tiene un factor de riesgo desarrolla cáncer de mama, eso no prueba que este haya sido la causa del cáncer (**American Cancer Society 2000**). El riesgo total de una mujer de padecer cáncer de mama a lo largo de su vida es de 1 en 12 (**Hill 1997**).

Los factores de riesgo que más ampliamente se aceptan para el cáncer de mama comprenden; el género, ya que la enfermedad es 100 veces más común en las mujeres que en los hombres. La edad es otro factor de riesgo importante ya que el 77% de las mujeres con cáncer de mama tienen más de 50 años al momento del diagnóstico y el número de casos en mujeres menores de 30 años es del 0.3%. Existen factores genéticos como mutaciones en genes supresores de tumores, como p53, BRCA1 y BRCA2 que incrementan el riesgo, así como la historia familiar y personal de cáncer de mama, la menarca temprana y climaterio tardío. Asimismo se especula que el no haber tenido un embarazo a término y no haber amamantado antes de los treinta años incrementan el riesgo de una mujer de contraer la enfermedad (**American Cancer Society 2000**).

Una forma específica de cáncer de mama es el hereditario o familiar que se caracteriza por aparición temprana, alta incidencia de enfermedad bilateral y asociación con otros cánceres (**Hill 1999**). La predisposición genética es responsable del 5-10% de todos los casos de cáncer de mama y, obviamente, de

un porcentaje mucho mayor de los casos de enfermedad temprana. Se han identificado un número de genes asociados con alto riesgo de cáncer de mama en los cuales se incluyen BRCA1 y BRCA2 los cuales tienen función de supresores de tumores y aunque la frecuencia de mutación en estos genes es baja, en ciertas poblaciones se pueden presentar hasta en 1% (**Ellisen 1998, Unger 2000**). Es posible que tanto BRCA1 como BRCA2 interactúen con Rad51, una proteína involucrada en reparación de daño a DNA y en recombinación meiótica. A diferencia de los genes BRCA, el gen de p53 se encuentra mutado en el 50% de los cánceres esporádicos de mama, lo cual indica que su principal papel se encuentra en la progresión tumoral más que en la predisposición genética (**Ellisen 1998, Unger 2000**).

Aunque la proporción de todos los cánceres de mama que pueden ser directamente atribuibles a factores hereditarios es baja, las predicciones epidemiológicas calculan que 36% de los casos de cáncer de mama diagnosticado por debajo de los 30 años de edad de la paciente pueden ser ligados a factores genéticos (**Ellisen 1998, Unger 2000**).

En los casos de cáncer de mama donde se involucran los genes supresores de tumores como BRCA1 y BRCA2 así como p53, se supone que estos deben actuar de manera recesiva ya que ambas copias del gen tienen que estar mutadas para que aparezcan células tumorales y se piensa que en los casos esporádicos ambos alelos presentan mutaciones somáticas en el tumor y en los casos hereditarios o familiares un alelo está mutado en la línea germinal y el otro ha mutado somáticamente en el tumor (**van de Vijver 1991**).

En cáncer de mama humano la amplificación y la delección de un número de genes es relativamente frecuente y, en cambio son relativamente raras las mutaciones puntuales y/o las translocaciones. La amplificación implica un incremento en el número de copias de un gen, de su RNA mensajero (RNAm) y de la proteína, lo que le otorga una ventaja selectiva de crecimiento a las células que

la presentan. Las mutaciones de los genes de la familia ras son raras en cáncer de mama humano, pero se ha visto que del 9 al 33% de los casos se asocian a amplificación del gen neu (también conocido como c-erb-B2 o HER-2) y esta amplificación correlaciona con un pronóstico pobre (**van de Vijver 1991**).

7. Papel de los estrógenos en cáncer de mama.

Las hormonas y factores de crecimiento son importantes para el crecimiento y diferenciación de la glándula mamaria normal y en el crecimiento de los tumores de mama. Entre ellos se incluyen los E₂, glucocorticoides, progesterona, prolactina y algunos factores de crecimiento como el IGF-1 e IGF-2, el EGF y los factores de crecimiento transformante α y β (TGF α y TGF β). En líneas celulares de cáncer de mama se ha visto que la dependencia hormonal, sobre todo a estrógenos, puede ser superada por una alta expresión del gen v-ras, pero debido a que las mutaciones puntuales de ras son poco comunes en cáncer de mama humano, se piensa que no están involucradas en el crecimiento estrógeno-independiente (**van de Vijver 1991**).

Las hormonas, tanto endógenas como exógenas al inducir la proliferación celular, incrementan el número de divisiones celulares y la oportunidad de errores genéticos fortuitos. Los errores en la replicación de DNA durante el ciclo celular generan mutaciones que en un arreglo espacio-temporal específico pueden dar lugar a un fenotipo maligno. El surgimiento de este fenotipo depende una serie de mutaciones somáticas que ocurren durante la división celular, pero los genes específicos involucrados en el proceso de carcinogénesis hormonal son aún desconocidos, aunque los candidatos deberían incluir los asociados a vías endocrinas, los de reparación de daño a DNA, los genes supresores de tumores y los oncogenes (**Henderson 2000**).

Actualmente se reconoce que la estimulación estrogénica es uno de los principales factores de riesgo para el desarrollo y mantenimiento del cáncer de

mama (**Henderson 1988, Hankinson 1997, Eisen 1998**). Una gran cantidad de evidencia epidemiológica y experimental implica a los E₂ en la etiología del cáncer de mama, y varios estudios en animales han demostrado que estos esteroides pueden inducir y promover tumores mamarios en roedores y que la ovariectomía o la administración de antiestrógenos tienen un efecto opuesto.

Aparentemente los factores de riesgo más ampliamente aceptados para cáncer de mama, como el sexo, la edad, la menarca temprana y gestación, lactancia y climaterio tardíos, se relacionan con una dosis acumulativa de estrógenos a la que el epitelio mamario es expuesto. Los resultados de 29 estudios epidemiológicos sobre niveles endógenos de estrógenos en mujeres posmenopáusicas muestran que las pacientes que subsecuentemente desarrollaron cáncer de mama presentan 15% más de concentración sérica de estradiol que las mujeres no afectadas. Aparentemente existe suficiente evidencia científica para establecer una estrecha asociación entre cáncer de mama y estrógenos (**Henderson 2000**).

Esta percepción es apoyada por algunos trabajos realizados en modelos animales de carcinogénesis inducida químicamente. Un modelo de cáncer de mama bien documentado es el de inducción por Nitroso-metilurea (NMU) en ratas. Con la simple inyección de este carcinógeno a los 50 días de edad, se desarrollan carcinomas de mama en un periodo de 6-12 meses y en el 80% de esos tumores se encuentran mutaciones en el gen c-Ha-ras donde se cambia una adenina (A) por una guanina (G) en el codón 12 (GGA cambia a GAA). En el caso de inducción por Dimetilbenzantraceno (DMBA) los tumores contienen el gen Ha-ras activado en el 25% de los casos y aquí la mutación activante se encuentra en el codon 61. Por lo tanto se acepta que la mutación puntual en Ha-ras es concomitante con la iniciación del proceso de carcinogénesis, pero se sabe que se requieren más etapas para el desarrollo del tumor y una de esas etapas involucra la acción de las hormonas, ya que la ovariectomización de las hembras antes de la exposición a NMU disminuye la aparición de tumores a niveles insignificantes. En estos

tumores las hormonas se comportan como un mitógeno que expande el número de células expuestas a la mutación (**van de Vijver 1991**).

De hecho 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 en mama.

Existe suficiente evidencia que, aunque el fenómeno de oncogénesis es multifactorial y multietapas, relaciona estrechamente la estimulación estrogénica y el cáncer de mama, ya que como se ha mencionado anteriormente, si descartamos los casos de cáncer de mama familiar que se asocian principalmente a mutaciones en los genes BRCA1 y 2, todos los demás factores de riesgo para cáncer de mama identificados epidemiológicamente se asocian a una exposición acumulativa a E₂ durante la vida de una mujer (**Henderson 1982, Thomas 1984, Henderson 1988, Marchand 1994**).

La inducción de tumores por estrógenos y sus esteres, fue descrita a finales de los años 1930, en cobayos y en 1940 en ratones. Recientemente la Agencia Internacional para Investigación en Cáncer determinó que la evidencia de la actividad carcinogénica del 17 β -estradiol en animales es suficiente para considerar esta hormona como un carcinógeno (**IARC 2000**). Se ha observado que la administración de E₂ a ratones incrementa la incidencia de tumores mamarios, hipofisarios, uterinos, vaginales y de hueso; en ratas los E₂ incrementan la incidencia de tumores de mama y de hipofisis (**Liehr 2000**). Es de mencionarse que estos modelos tumorales fueron desarrollados usando dosis farmacológicas con el objeto de observar la actividad tumorigénica de estas hormonas en un periodo de tiempo corto.

En humanos es aceptado que niveles ligeramente más elevados de estrógenos son un factor de riesgo para el cáncer de mama, también se acepta que los estrógenos exógenos elevan el riesgo de tumores mamarios. Aparentemente los estudios de modelos animales de cáncer mamario y los epidemiológicos en humanos identifican plenamente a los E₂ como carcinógenos y es por esto que la IARC considera que existe evidencia suficiente para clasificar a los estrógenos como carcinógeno, obviamente como un carcinógeno débil comparado con otros carcinógenos de laboratorio como el NMU, el DMBA y el benzopireno, lo cual es claramente entendible si consideramos que los estrógenos son hormonas endógenas activas a niveles picomolares, una gran actividad carcinogénica representaría una desventaja evolutiva para muchas especies **(Liehr 2000)**.

Los estudios que se han realizado para determinar la genotoxicidad de los E₂ se han enfocado en los catecolestrógenos y sus metabolitos ya que son hidroquinonas que pueden ser fácilmente oxidadas a quinonas y semiquinonas reactivas a DNA, pero este mecanismo carcinogénico no requiere de la presencia del RE, por lo que se piensa que la ruta de la estimulación estrogénica mediada por receptor representa una vía que se liga indirectamente, por medio de la inducción de la proliferación celular, y no directamente, por medio de inducción de daño a DNA, al proceso de oncogénesis **(Liehr 2000)**

Independientemente de su probable actividad como inductor primario de tumores, por su actividad mutagénica, se cree que los E₂ también pueden, por su actividad proliferativa mediada por el receptor de estrógenos (RE), fijar cualquier daño a DNA tanto inducido o espontáneo, que provea a las células tumorales de una ventaja adaptativa sobre las células normales. **(Liehr 2000)**.

De hecho uno de los eventos clínicos de mayor importancia tanto en el diagnóstico como el pronóstico y estrategias de tratamiento en las pacientes de cáncer de mama 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) (**Henderson 1982, Thomas 1984, Henderson 1988, Marchand 1994**)

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 Hidroxi-tamoxifen (TAM) que es el de uso clínico generalizado, pero los tumores desarrollan resistencia a la terapia dentro de los siguientes 5 años aproximadamente (**van de Vijver 1991, McDonnell 1995**).

Se puede decir que existen dos tipos de cáncer de mama, i) los que expresan en RE y que, en principio, responden a estimulación estrogénica e inhibición antiestrogénica, que se denominan RE+, y ii) los que no lo expresan (RE-) y que por lo tanto no responden ni a E₂ ni a antiestrógenos (**Mcguirre 1986, van Agthoven 1993**).

El curso clínico de ambas entidades es diferente, y se sabe que los tumores RE+ presentan un fenotipo menos agresivo, responden mejor a la quimio y radioterapia así como a la terapia adyuvante con antiestrógenos y la sobrevida de las pacientes es mayor y de mejor calidad. Contrariamente las pacientes con tumores RE- responden mal a los tratamientos y en general presentan una menor sobrevida (**McDonnell 1995**). Estos hechos evidencian diferencias en el ámbito celular entre ambos tipos de tumores que, aparentemente, podrían representar únicamente diferencias en la expresión del RE y las implicaciones de respuesta a estímulos en la maquinaria celular que ello conlleva.

Desafortunadamente las pacientes con tumores mamarios RE+, progresan hacia independencia hormonal, que puede implicar la pérdida de la expresión del RE y progresión hacia el fenotipo más agresivo (**van de Vijver 1991**). Las causas de este fenómeno no se conocen, aunque se ha observado que en algunos casos se asocia con la sobreexpresión del protooncogen Ras (**van Agthoven 1993**), con la presencia de islotes GpC hipermetilados en el extremo 5' del gen del RE (**Ferguson 1995, Lapidus 1997**) o con la expresión constitutiva del factor nuclear

κ B (**Nashatri 1997**). Las causas que inducen la pérdida de expresión del RE por células que en condición normal lo expresaban se desconocen, aunque se piensa que puede formar parte del proceso de des-diferenciación celular que es común en las células que han sufrido inmortalización y transformación neoplásica tanto in vivo como in vitro.

8. Efecto de la reexpresión del RE en líneas celulares de cáncer de mama.

De capital interés han sido algunos estudios realizados durante la última década en los cuales se sugiere que la reexpresión del RE en diversas líneas celulares, incluyendo algunas de cáncer de mama humano que no expresan el RE (RE-) correlaciona con una disminución de la proliferación y capacidad invasiva de las células tumorales.

Aunque de hecho actualmente no se conocen del todo los mecanismos que operan en la regulación del crecimiento celular y tisular por los estrógenos, se sabe que en el tejido normal estrógeno-dependiente, la estimulación hormonal del crecimiento y diferenciación son controlados cuidadosamente. Por el contrario, la proliferación de células cancerosas dependientes de estrógenos es descontrolada y aberrante. Se sabe que la estimulación estrogénica induce la expresión de múltiples genes involucrados en la regulación de la proliferación celular, como los protooncogenes c-myc (**Murphy 1987**), c-fos (**Hyder 1994**) y c-jun (**Webb 1993**, **Nephew 1994**) y además puede, paralelamente, inhibir la expresión de genes de arresto específico del crecimiento (genes *gas*) con lo que incrementa su potencial proliferativo (**Ferrero 1993**).

Esto ha llevado a un creciente interés por determinar si la expresión del RE en un linaje celular es suficiente para hacerla sensible a los efectos en proliferación inducidos por E_2 . Con este fin se transfectó establemente el DNAc del RE humano en células 3T3 (fibroblastos de ratón no sensibles a E_2) y se observó que la estimulación con E_2 no tenía un efecto promotor del crecimiento, sin embargo en

una clona que exhibía características de células transformadas, los E₂ mostraron un efecto inhibitor del crecimiento y eventualmente, cierta citotoxicidad (**Gaben 1991**). Este mismo efecto ha sido observado en otras líneas celulares que normalmente no expresan el RE y que son transfectadas establemente con el gen que codifica para este receptor, por ejemplo en células HeLa (carcinoma cervicouterino humano) la estimulación con E₂ causa inhibición de la proliferación y este efecto correlaciona con los niveles de expresión del RE (**Maminta 1991**). Asimismo cuando el experimento se realizó en células CHO (ováricas de hamster Chino) se observó este mismo efecto inhibitor del crecimiento, e incluso tóxico, de los E₂ (**Kushner 1990**).

Por otro lado en algunos estudios in vitro relacionados con los efectos de los E₂ sobre el crecimiento de líneas celulares de osteosarcoma RE+, se demostró que la estimulación estrogénica induce proliferación celular (**Gray 1987, Kaye 1990**), sin embargo cuando la línea de osteosarcoma humano HTB96, RE-, se transfectó establemente con el gen que codifica para el RE α humano (RE α h) se observó una inhibición del crecimiento en respuesta al tratamiento con E₂ (**Watts 1989, Watts 1994**). Este mismo efecto inhibitor de la proliferación celular fue observado en la línea celular de osteosarcoma de rata Ros17/2.8 cuando se le transfectó el RE α de ratón (**Migliaccio 1992**).

Un hecho conocido es que la proliferación de las líneas celulares de cáncer de mama RE+, como MCF7 y T47D, es altamente estimulada por E₂ (**Dickson 1988**), pero se ha visto que la inducción de la expresión de un RE α exógeno en líneas celulares de cáncer de mama humano RE-, como MDA-MB 231 (**García 1992, Jiang 1992, Zajchowski 1993**), 21T (**Zajchowski 1993**), MDA-MB-468 (**Wang 1997**) y en líneas celulares de mama normal RE- inmortalizadas in vitro (**Zajchowski 1991, Zajchowski 1993**), en todos los casos correlaciona con una disminución de la proliferación de esas células al tratamiento con E₂.

Este fenómeno inhibitor de los E₂ es paradójico, dado que en condiciones normales tienen efectos mitogénicos debido a la inducción y regulación de varios genes cuyos productos controlan el ciclo celular, como c-myc, c-fos y c-jun y que además pueden presentar un efecto indirecto sobre la proliferación celular a través de la inducción de timidina cinasa (**Kasid 1986**), cathepsina D (**Rochefort 1989**) y la regulación de diversos miembros de la familia del factor de crecimiento transformante β (TGF β) (**Knabbe 1987, Arrick 1990**). Los E₂ también regulan la expresión de otros genes como el del receptor a progesterona (RPg) (**Kaneko 93, Bhattacharyya 1994**), el del factor de crecimiento epidérmico y su receptor (EGF y EGFr) (**Nelson 1991, Ignar-Trowbridge 1996, Curtis 1996**), el factor de crecimiento similar a insulina 1 (IGF-1) (**Ma 1994, Clayton 1997, Klotz 2000**), prolactina (PRL) (**Yen 1974**) y el gen de ovoalbumina (**Gaub 1993**) y la expresión de estos genes regulados por E₂ es tejido-específica. Parte de esta especificidad puede ser atribuida a la expresión del RE, sin embargo la expresión diferencial de los genes de respuesta a E₂, aún en tejidos que expresan el RE, indica que son necesarios otros factores tejido-específicos para explicar la complejidad de los efectos estrogénicos en los tejidos estrógeno-dependiente.

Estos factores pudieran ser los recientemente descubiertos correguladores (**Takimoto 1999, Montano 1999**) y/o coactivadores (**Oñate 1995, Gee 1999**) que son de expresión tejido-específico y que se ha visto que juegan un papel importante en la expresión diferencial de genes, en respuesta a estimulación estrogénica en los tejidos estrógeno-dependientes.

Para tratar de entender el efecto inhibitor de los E₂ sobre la proliferación de las células transfectadas con el RE es, por lo tanto, necesario estudiar los efectos directos e indirectos que la estimulación estrogénica, actuando sobre un RE exógeno, presenta sobre los genes endógenos involucrados en la regulación del ciclo celular y de la proliferación.

Se pueden sugerir algunas explicaciones para describir los efectos antimitogénicos de los E₂ en las células transfectadas con el RE; i) la inducción de la expresión de genes que codifican proteínas inhibitoras del crecimiento y/o citotóxicas debida a rearrreglos genéticos consecuencia de la transfección (**Gaben 1991**), ii) la expresión constitutiva elevada del RE, lo que llevaría a una interferencia transcripcional, afectando otros genes que normalmente no responden a E₂ (**Watts 1989, Webb 1992, Watts 1994**), y iii) que en realidad la transfección estable del RE α en células de cáncer de mama, que han perdido la capacidad de expresarlo, recree, al menos en parte, un fenotipo estrógeno-dependiente que permita eventos reguladores que se habían perdido en el proceso de desdiferenciación celular presente en todo proceso de inmortalización celular y transformación neoplásica. Esta última posibilidad es la que estimula los trabajos que se realizan en este sentido, por que a pesar de que el significado real de este tipo de hallazgos aún está por establecerse, el potencial que representan, sobre todo con intención terapéutica, podría ser de suma importancia en el futuro.

Una de las principales objeciones a los trabajos citados anteriormente, radica en el hecho de que se evalúan los efectos antiproliferativos de los E₂ al comparar las clonas transfectadas con las líneas celulares parentales no transfectadas o en aparente ausencia de E₂, desde y, por lo tanto, estas diferencias en proliferación pudieran deberse a la transfección misma reflejando resultados espurios, que no reflejan una diferencia fisiológica real de las transfectantes con su clona de origen.

Es por esta razón que el objetivo de este trabajo fue propuesto con la finalidad de evaluar el efecto que los E₂ tiene sobre la proliferación de la línea celular de cáncer de mama RE- denominada MDA-MB 231, en la cual se ha re-expresado establemente el gen que codifica para la forma silvestre del RE α (HEGO) usando el sistema de regulación de la expresión genética dependiente de tetraciclina de Gossen y Bujard (TetOff System) el cual permite regular la expresión, en este caso de este receptor, en forma dosis-dependiente del antibiótico (**Gossen 1992, Gossen 1995**).

Objetivo General.

Evaluar el efecto de la reexpresión del RE α sobre la proliferación de la línea celular de cáncer de mama MDA-MB 231 en respuesta al tratamiento con estrógenos.

Objetivos Particulares.

- 1. Establecer un modelo celular de cáncer de mama humano en el que sea posible regular la expresión del RE α .**
- 2. Analizar la proliferación de este modelo celular en condiciones experimentales de estimulación con estrógenos en presencia y ausencia del RE α .**
- 3. Evaluar la expresión del receptor de progesterona en respuesta a estimulación estrogénica en presencia y ausencia del RE α .**

Metodología.

a) Cultivo celular.

La línea MDA-MB-231 (ATCC # HTB-26) se cultivó en medio Leibovitz L15 (GIBCO) suplementado con 10% suero bovino fetal (FBS, GIBCO), 2 mM de glutamina (SIGMA) y mezcla de antibiótico/antimicótico (GIBCO) (**Medio normal**). La línea CHO (Chinese Hamster Ovary) AA8 (Clontech) que expresa establemente el TetTA y que se usó como control positivo para los ensayos de luciferasa, se cultivó en Alpha-MEM (Hyclone), suplementado de la misma manera. Todas las líneas celulares se cultivaron en ambiente de 5% de CO₂ a 37 ° C, en una incubadora Forma Scientific modelo 3158. Para los ensayos con el gen reportero pTRE-LUC se usaron los mismos medios, suplementados con FBS libre de tetraciclina (Clontech) y cuando se usó pERE-CAT se cultivaron las células en medio Leibovitz L15 sin rojo fenol y suplementado con FBS libre de tetraciclina previamente tratado con carbón activado para deprivar de hormonas esteroides.

Para la inhibición de la expresión del RE se utilizaron 10 µg/ml de Doxiciclina (DOX, SIGMA). Para los ensayos en presencia del RE se dejó el medio libre de DOX.

La selección de las clonas positivas para la primera transfección estable se realizó con higromicina B (BOEHRINGER) a concentración de 300 µg/ml y para la segunda transfección, 20 µg/ml de puromicina (SIGMA); para el mantenimiento de las clonas resistentes se usó la mitad de esas dosis.

b) Plásmidos.

Se usaron las construcciones pTet-Off (Fig. 6) y pTKHyg (resistencia a higromicina B, Tet-Off system, Clontech) para la primera transfección estable y pTRE-HEGO (Fig. 7) y pRST (resistencia a puromicina, Tet-Off System, Contech) para la segunda transfección estable. Además usamos pTRE+LUC como

reportero para evaluar la capacidad de regulación de la actividad del tetTA y pERE-CAT para evaluar la capacidad de regulación de la expresión de RE α .

Todos los plásmidos se amplificaron en la cepa DH5 α de E. Coli competente y se aislaron y purificaron con el kit de purificación de DNA-plásmido Concert high purity Maxi-prep-DNA system (GIBCO) de acuerdo al protocolo del fabricante. Se determinó concentración y pureza de DNA por medio de análisis espectrofotométrico de absorbancia a 260 y 280 nm. de longitud de onda considerando siempre una relación $DO_{260}/DO_{280} > 1.8$

c) Subclonación del gen HEGO en pTRE.

Tanto las digestiones con endonucleasas de restricción, como el aislamiento y purificación del inserto, así como la linearización del vector se realizaron de acuerdo a las técnicas descritas en Current Protocols in Molecular Biology (**Ausubel 1997**). El aislamiento y purificación del gen HEGO se realizó por digestión de pCMV-HEGO (amablemente donado por el Dr. Joerg Klug, Institut fur Molekularbiologie und Tumorforschung, Marburg, Alemania.) con Eco R1 y electroforesis en gel de agarosa de bajo punto de fusión (Promega) al 1% y su posterior digestión con β -agarasa (2 U/200 μ l de agarosa, Promega), el vector (pTRE) se linearizó con la misma enzima de restricción y se trató con fosfatasa alcalina para inhibir su recircularización.

La ligación se realizó con T4DNA ligasa (GIBCO) y se transformó la cepa DH5 α de E. Coli, las transformantes positivas se seleccionaron con 100 μ g/ml de ampicilina en medio sólido terrific Broth (GIBCO).

Posterior a la selección de las clonas transformantes con los productos de ligación del inserto HEGO/EcoR1 en pTRE se procedió a determinar el sentido de la inserción, para ello se utilizó la técnica del mapeo de restricción, se determinó usar las enzimas de restricción Xba 1 y Hind III debido a que, tanto el vector como el

inserto, presentan un sitio único de restricción para ambas enzimas. La **figura 4** muestra el patrón de restricción con las enzimas Xba 1 y Hind III, de dos clonas positivas para el vector-inserto, en el que podemos ver que, de acuerdo al patrón esperado, los carriles 3 y 7 muestran la posición adecuada del inserto (sentido), los carriles 2 y 6 muestran una clona en la que la inserción está en antisentido. El carril 1 corresponde a DNA del fago ϕ 174 digerido con Hae III, que constituye un marcador de peso molecular, así como las bandas en el carril 4 que corresponden a DNA del fago λ digerido con Hind III; finalmente en el carril 5 se observa el vector-inserto sin digerir. La clona usada para amplificar el vector pTRE-HEGO fue la que se encuentra en los carriles 3 y 7.

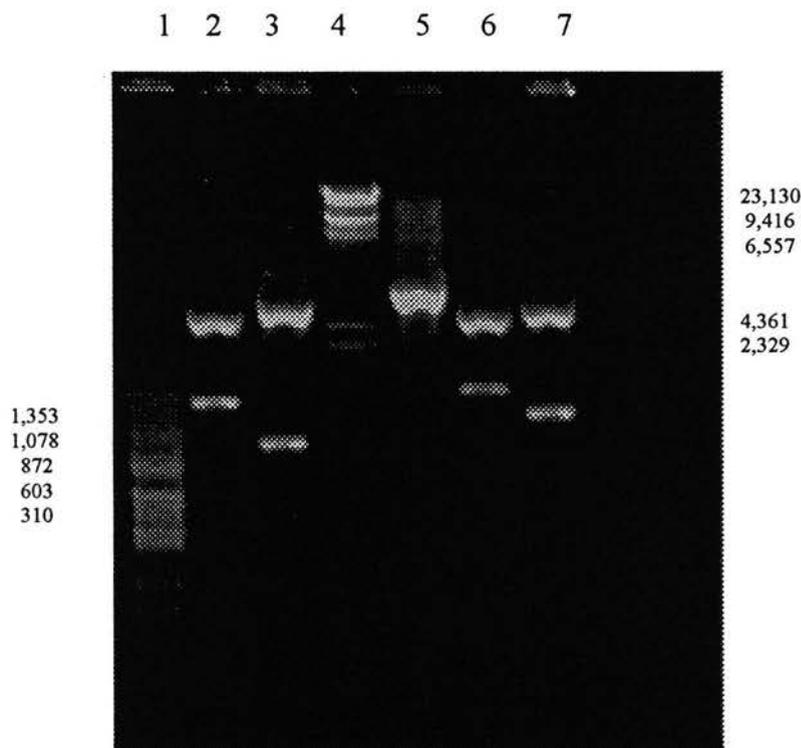


Figura 4. Patrón de restricción del vector pTRE-HEGO para identificar el sentido de la inserción del gen HEGO.

CARRIL	DNA	ENZIMA
1	ϕ 174	Hae III (MPM)
2	pTRE-HEGO	Xba 1 (antisentido)
3	pTRE-HEGO	Xba1 (sentido)
4	λ	Hind III (MPM)
5	pTRE-HEGO	sin digerir.
6	pTRE-HEGO	Hind III (antisentido)
7	pTRE-HEGO	Hind III (sentido)

Enzima de restricción Xba 1

Plásmido	Posición	No. de fragmentos	Longitud
pTRE(circular, 3146 pb).	477	1	3146 pb.
HEGO(lineal 1822 pb)	1151	2	1134, 671 pb.
pTRE-HEGO (sentido)	1601, 2299	2	698, 4270 pb.
pTRE-HEGO(antisentido)	1121, 2299	2	1178, 3790 pb

Enzima de restricción Hind III.

Plásmido	Posición	No. de fragmentos	Longitud
PTRE	941	1	3146
HEGO	1033	2	1016, 789
pTRE-HEGO(sentido)	1483, 2763	2	1280, 3688
pTRE-HEGO(antisentido)	1239, 2763	2	1524, 3444.

Los marcadores de peso molecular usados fueron:

- ϕ 174/Hae III que genera 11 fragmentos de:

1353, 1078, 872, 603, 310, 281, 271, 234, 194, 118 y 72 pb

- λ DNA / Hind III que genera 8 fragmentos de;

23 130, 9 416, 6 557, 4 361, 2 322, 2 027, 564 y 125 pb.

d) Determinación de la concentración óptima de selección con higromicina B

Para determinar la concentración óptima de selección de las transfectantes positivas de la primera transfección estable, se sembraron 2×10^5 células MDA-MB 231 en cajas Petri para cultivo celular de 60 mm de diámetro con medio normal y se adicionaron 0, 100, 200, 300, 400, 600 y 800 $\mu\text{g/ml}$ de higromicina B y, por último se eligió la concentración mínima que inició la muerte masiva los 5 días y que eliminó todas las células a los 14 días.

e) Determinación de la concentración óptima de selección con Puromicina.

Para determinar la concentración adecuada para la selección de las transfectantes positivas de la segunda transfección estable, se sembraron 2×10^5 células de la clona MDA-A4, seleccionada de la primera transfección estable, en cajas Petri de cultivo celular de 60 mm. de diámetro y se añadió al medio normal 0, 5, 10, 20, 25, 30, 35, 40, 45 y 50 $\mu\text{g/ml}$. de puromicina. Se eligió la concentración mínima del antibiótico que inicie la muerte celular masiva a los 5 días de cultivo y que eliminó todas las células a los 14 días.

f) Determinación de la densidad celular óptima para selección.

Para determinar la densidad celular óptima de selección de las transfectantes positivas, la línea MDA-MB 231, se sembraron 5×10^4 , 10^5 , 2×10^5 , 5×10^5 , 10^6 , 5×10^6 células en cajas Petri para cultivo celular de 60 mm. de diámetro con medio suplementado con 300 $\mu\text{g/ml}$ de higromicina B y se eligió la densidad celular que presento 80 % de confluencia al día 5 de cultivo. Asimismo para determinar este parámetro en la clona MDA-A4 se siguió la misma estrategia pero usando la concentración de puromicina en 20 $\mu\text{g/ml}$.

g) Transfecciones transitorias.

Todas la transfecciones 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 1997**). Después de la transfección las células se cultivaron durante 48 hrs., se levantó la monocapa por raspado y se lisaron por 5 ciclos sucesivos de congelamiento-descongelamiento (3 min/cada uno). Se almacenaron a -20°C para su posterior uso en los ensayos de expresión de genes reporteros.

h) 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 (pTK-Hyg) y para la segunda el de puromicina (pRST) para que la selección de las clonas positivamente transfectadas se efectúe con este antibiótico. La diferencia fundamental estriba en que las clonas establemente transfectadas se conservan como líneas permanentes (**Ausubel 1997**).

i) 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, en ambiente estéril, con una micropipeta con punta de 200 μ l de capacidad, cada colonia fue pasada a una caja individual y cultivadas para su posterior análisis con el gen reportero adecuado.

j) Análisis de la expresión de genes reporteros

i) 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 luciferasa (**Brasier 1992**) que fueron realizados con el plásmido pTRE-LUC de acuerdo a la técnica descrita previamente (**Ausubel 1997**). En la primera fase se hicieron ensayos de "todo o nada", es decir, con y sin 1 μ g/ml de DOX 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 DOX dentro del rango exponencial 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 DOX en forma dosis-dependiente se pasó a la segunda transfección estable. Estos ensayos se realizaron en medio Leibovitz L-15 suplementado con SBF libre de tetraciclina (Clontech)

ii) 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 α . 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 (10⁻⁸ M), en ambos casos, y en presencia (10 μ g/ml) o ausencia de DOX, y la segunda en curvas dosis respuesta en donde se mantuvo la misma concentración de E₂ y se observó la respuesta del reportero a concentraciones exponencialmente crecientes de DOX (0-10 μ g/ml).

Estos experimentos se realizaron en medio Leibovitz L-15, sin rojo fenol (GIBCO), suplementado con SBF libre de tetraciclina, el cual fue tratado previamente con carbón activado, 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 autorradiografía (**Sambrok 1989**). El análisis se realizó por medio de densitometría con el programa Collage 2.0 (Image Dynamics Corp.) y los resultados fueron corregidos por actividad de β galactosidasa que se usó como control interno de eficiencia de transfección

k) Curvas de proliferación celular (Butler 1991, Freshney 1991).

Se sembraron 5X10⁴ células por pozo en placas de cultivo de 6 pozos, en las condiciones descritas en la tabla 1, se inició la cuenta a las 24 hrs. lo cual

constituye el tiempo cero y se contó cada 24 hrs. La cuenta se realizó en un contador de células nucleadas Coulter modelo T-660 por triplicado para cada tratamiento. Para los pozos con estímulo el medio de cultivo fue Leibovitz L15 sin rojo fenol suplementado con FBS libre de tetraciclina tratado con carbón activado.

POZO	TRATAMIENTO
1	Medio de cultivo normal
2	17 β -estradiol (10^{-8} M)
3	17 β -estradiol (10^{-8} M) + ICI 182,780 (10^{-8} M)
4	17 β -estradiol (10^{-8} M) + OH-TAM (10^{-6} M)
5	17 β -estradiol (10^{-8} M) + Doxiciclina (10 μ g/ml)
6	Vehículo (Etanol absoluto, 1000X)

Tabla 1. Esquema de tratamiento aplicado a la clona MDA-A4-5/2 para evaluar el efecto proliferativo de; 17 β -estradiol (**2**), ICI 182,780 (antiestrógeno puro, **3**), 4-hidroxitamoxifen (antiestrógeno parcial, **4**), doxiciclina (inhibidor de la expresión del RE α , **5**) y el vehículo en que se encuentran solubilizados los fármacos (etanol absoluto, **6**).

I) Determinación de la fracción celular en fase “S”

Se evaluó a través del establecimiento del ciclo celular por medio de tinción con Ioduro de propidio (PI) en un citómetro de flujo Coulter-EPICS-ALTRA. Usamos cultivos celulares, previamente sincronizados, que se encontraban en fase de crecimiento logarítmico, cultivados en medio suplementado de acuerdo a la tabla 1.

Para sincronizar las células se cultivaron en cajas de Petri de 60 mm de diámetro en medio de cultivo normal hasta una confluencia del 50%, se cambió el medio por Leibovitz-L15 sin rojo fenol suplementado con 0.5% de FBS libre de tetraciclina tratado con carbón activado, se incubaron durante 72 horas (**García 1999**).

Posteriormente se sometieron al esquema de estimulación establecido en la tabla 1 por 48 hrs.

Una vez concluido el periodo de estimulación, las monocapas celulares se tripsinizaron y se resuspendieron en 2 ml de PBS, se alicuotaron para obtener 5×10^5 células/50 μ l., se realizó la tinción con Ioduro de propidio para ciclo celular con el Kit DNA-PREP (Beckman-Coulter), de acuerdo con el protocolo del fabricante. Se incluyeron en cada ensayo núcleos de eritrocitos de pollo como control de contenido de DNA y linealidad del equipo y linfocitos humanos normales para referencia de contenido de DNA diploide en fase G₀-G₁. El análisis de las muestras se realizó en el citómetro Coulter-EPICS-ALTRA y los resultados se adquirieron con el software EXPO, usando 488 nm de longitud de onda para la excitación y la emisión se registró con el fotomultiplicador 4 (PMT 4, PI/DNA).

El análisis de resultados se llevó a cabo con el software Multicycle (Phoenix Flow Systems) para ciclo celular (% de células en fase G₀/G₁, S y G₂/M) en las condiciones experimentales establecidas.

m) Análisis estadístico

Los resultados de la cuenta celular y de la fracción celular en fase "S", se analizaron por ANOVA de mediciones repetidas y post-prueba de comparaciones múltiples de Tukey ($\alpha < 0.05$), con el programa Prism 2.01 (Graph Pad Software).

n) Análisis de unión hormona-receptor.

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), se agregaron concentraciones crecientes de

la hormona marcada (2,4,6,7-³H- estradiol, actividad específica 72 μ Ci/mmol, 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).

Transcurrido el periodo de incubación, se lavaron los pozos 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 celulares se midió en un contador de centelleo líquido, los parámetros termodinámicos, Bmax (unión máxima) y Kd (constante de disociación), se determinaron por medio de regresión no lineal ajustada a una hipérbola, utilizando el programa Prism 2.01 (Graph Pad Software). Los ensayos se realizaron por duplicado para cada una de las concentraciones de hormona marcada.

o) Amplificación por RT-PCR del gen endógeno del receptor a progesterona.

Se analizó la expresión del gen endógeno de progesterona en la línea MDA-A4-5/2. Las células se cultivaron en medio Leibovitz L15 sin rojo fenol, suplementado con suero bovino fetal libre de tetraciclina (Clontech) tratado con carbón activado y 10^{-8} M de E₂, en presencia o ausencia de 10 μ g/ml de Dox.

Se aisló RNA total de la línea celular MDA-A4-5/2 con el método de un paso basado en la extracción con isotiocianato de guanidina/fenol/cloroformo (TRI-Pure, Boehringer, Alemania) (Chomczynsky 1987) . Se incubaron 4 μ g de RNA total con 800 unidades de transcriptasa reversa (SuperScript II, GIBCO) en 20 μ l de volumen de reacción con 20mM de tris-HCl (pH 8.3), 75 mM de KCl, 3 mM de MgCl₂, 10 mM de DTT, 0.5 mM de cada dNTP y 2.5 μ M de oligo d-T. Posteriormente 10 μ l de esta reacción fueron amplificados por PCR con primers específicos para un fragmento de 242 pb del gen de la isoforma B del receptor a progesterona (sentido: 5'-TGA CTG AGC TGA AGG CAA AG-3', antisentido: 5'-CGA CAG CGA CTG CTG GTC-3'). Los otros 10 μ l fueron usados para amplificar

simultáneamente un fragmento del gen de β -actina (control de expresión constitutiva) (**Camacho 1996**).

La reacción de PCR se llevó a cabo en 50 μ l de volumen de reacción con Tris-HCl 20 mM (pH 8.3), KCl 50 mM, MgCl₂ 1 mM, dNTP's 0.2 mM de cada uno, 0.5 μ M de cada primer, y 2.5 U de Taq-DNA polimerasa. Se realizaron 30 ciclos de amplificación a 94°C, 1 min., 60°C, 1 min. y 72°C, 1 min. y un paso final de extensión a 72°C por 5 min. (**González 2001**). Como control positivo se usó RNA total de la línea celular de cáncer de mama humano MCF-7 cultivada en las mismas condiciones. Se incluyeron en todos los experimentos controles negativos sin RNA y con RNA no retrotranscrito.

Los productos de amplificación (25 μ l) fueron separados en gel de agarosa al 2%, teñidos con bromuro de etidio y la imagen fue capturada a partir de un transiluminador ultravioleta con el software Collage.

Resultados.

Primera transfección estable.

Se aislaron 105 clonas resistentes a higromicina B, 80 de las cuales se ensayaron con el gen reportero pTRE-LUC. La clona denominada MDA-A4 mostró regulación de la expresión de este reportero en forma dosis-dependiente de DOX. La **figura 5** muestra la gráfica de regulación de la expresión de LUC en función de concentraciones exponencialmente crecientes de DOX. El nivel de inhibición es de 15 veces, a concentración de 1.0 $\mu\text{g/ml}$, con respecto a cuando las células se incuban en ausencia de DOX.

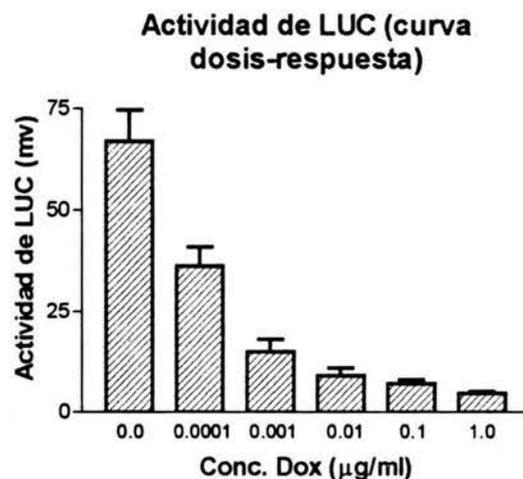


Figura 5. Actividad de Luciferasa en la clona MDA-A4, en función de concentraciones exponencialmente crecientes de Doxyciclina. Datos de un experimento representativo por triplicado; corregidos por eficiencia de transfección de β galactosidasa(mv= milivolts).

Como se puede observar la curva de regulación de actividad de luciferasa (LUC) en la clona MDA-A4 nos indica que la actividad del transactivador de tetraciclina (tetTA) sobre el plásmido de respuesta a tetraciclina (pTRE) que controla la expresión del reportero de LUC es regulada de manera dosis-dependiente por el antibiótico en el rango de 0.0 a 1.0 $\mu\text{g/ml}$, esto implica que la expresión constitutiva del tetTA en esta clona es la apropiada para que su capacidad activadora sobre el pTRE sea regulada por DOX en este rango de concentración, hasta prácticamente

apagar la expresión del reportero a la dosis de 1.0 $\mu\text{g/ml}$., por lo que esta clona fue usada para efectuar la segunda transfección estable.

Segunda transfección estable:

La clona MDA-A4, fue transfectada establemente con el vector pTRE-HEGO. Posterior a la transfección se aislaron 120 clonas resistentes a puromicina, 55 de las cuales se ensayaron con el gen reportero pERE-CAT. Encontramos que en la clona denominada MDA-A4-5/2 la expresión del reportero de CAT es regulada de forma dosis- dependiente de DOX, en presencia de E_2 (10^{-8} M), alcanzándose una inhibición máxima del 90% cuando se incubó en presencia de 10 $\mu\text{g/ml}$ de este antibiótico. La **figura 6** muestra los datos de actividad de CAT en función de concentraciones crecientes de DOX.

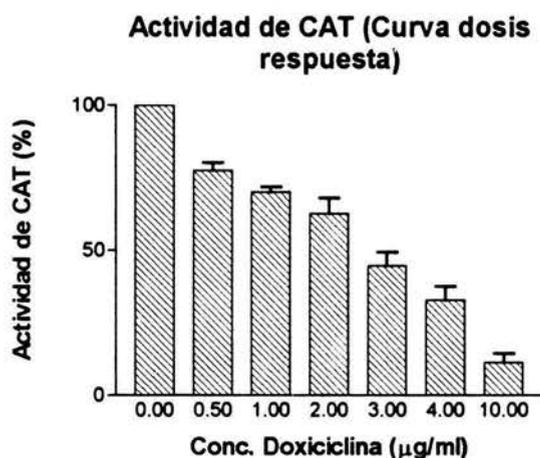


Figura 6. Curva de regulación de actividad de CAT en la clona MDA-A4-5/2. Datos de 3 experimentos representativos; corregidos por eficiencia de transfección por β -galactosidasa. La actividad de CAT en ausencia de DOX fue establecida como el 100% de actividad.

Estos resultados indican que la clona denominada MDA-A4-5/2 presenta las características de regulación para la expresión del reportero de CAT en respuesta a la estimulación estrogénica (17β -estradiol, 10^{-8} M) dentro del rango comprendido entre 0 y 10 $\mu\text{g/ml}$, de DOX, logrando una inhibición del 90% con la máxima concentración del antibiótico, lo que significa que en esta clona la

actividad del TetTA sobre el vector pTRE-HEGO es regulada en la misma forma, pero como es evidente no se logra la inhibición total de la expresión del reportero y se conserva aproximadamente el 10% de esa expresión con respecto al sistema libre de DOX, esto puede deberse a que los promotores virales, como los que regulan la expresión de reportero pERE-CAT, pueden comportarse diferencialmente de acuerdo al contexto celular en que se encuentren y algunas veces su expresión constitutiva es alta y por lo tanto, en este caso, no representaría una condición que responda a la activación transcripcional ejercida por el tetTA sobre el reportero.

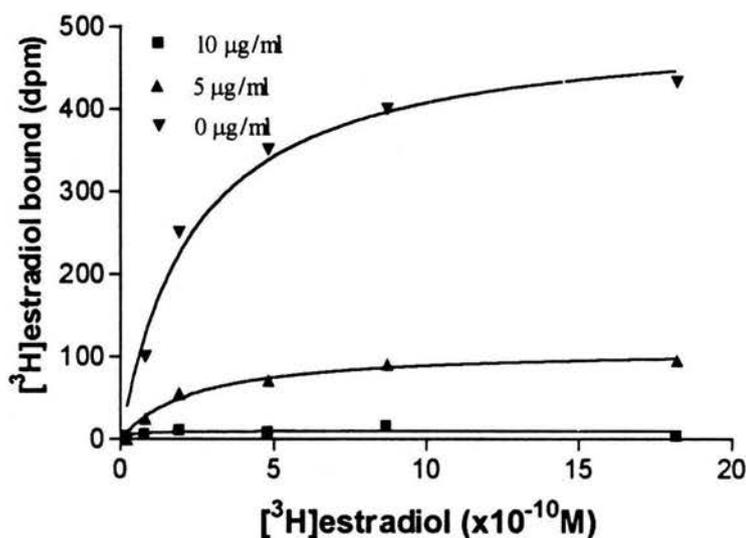
Para dilucidar esta posibilidad, se realizaron ensayos de unión hormona-receptor en la clona MDA-A4-5/2 que nos permitieran cuantificar los niveles de expresión del $RE\alpha$ en nuestra línea celular.

Análisis de unión Hormona-Receptor.

Para establecer los niveles de expresión del $RE\alpha$ en función de la concentración de DOX, en la línea celular MDA-A4-5/2, realizamos ensayos de curvas de desplazamiento por competencia, también denominados ensayos de unión hormona-receptor, que proporciona los datos necesarios para calcular el número de sitios de unión para la hormona en las células (B_{max} , unión máxima) y la constante de afinidad del receptor por la hormona (K_d). En la **figura 7** se pueden observar las curvas de saturación para 3 diferentes niveles de expresión del $RE\alpha$ en nuestra línea celular.

Como se puede ver en la gráfica los niveles de expresión del receptor disminuyen cuando aumenta la concentración de DOX, ya que cuando no se agrega el antibiótico la curva tiende a la saturación (comportamiento farmacológico que presentan los complejos receptor-ligando) en un mayor nivel y conforme se aumenta la dosis de DOX se disminuye el nivel de saturación lo cual significa que existen menos sitios de unión para la hormona. Cuando la concentración es de 10

$\mu\text{g/ml}$ es claro que la curva no tiende hacia la saturación, se comporta como una línea recta lo que, muy probablemente, implica que existen muy pocos sitios de unión para la hormona o que, en definitiva, no existen. La tabla de la figura 6 contiene los valores de expresión del RE y las constantes de disociación (K_d) para tres diferentes concentraciones de DOX.



[DOX]	Bmax	Kd	Moléculas $\text{RE}\alpha/\text{célula}$
10 $\mu\text{g/ml}$.	9.67 dpm	0.26 nm.	365
5 $\mu\text{g/ml}$.	109.8 dpm	2.36 nm.	4,100
0 $\mu\text{g/ml}$.	505.1 dpm	2.36 nm	19,000

Figura 7. Curvas de saturación por competencia de unión hormona-receptor. La tabla inferior muestra la concentración de DOX y los valores obtenidos en el ensayo, así como los valores calculados del número de moléculas del receptor a partir de Bmax y la K_d . Datos de un ensayo representativo por duplicado.

Con base en estos resultados decidimos utilizar esta clona como modelo celular para evaluar el efecto proliferativo de los E_2 en presencia y ausencia del $\text{RE}\alpha$.

Curvas de proliferación.

Inicialmente elaboramos las curvas de proliferación de la clona MDA-A4-5/2 de acuerdo a como se indica en material y métodos y en las condiciones de estimulación marcadas en la tabla 1.

Se procedió a establecer la capacidad proliferativa por cuenta directa de nuestra línea celular en varias condiciones; i) de expresión (E_2), ii) no expresión ($E_2 + DOX$) del $RE\alpha$, iii) bloqueo del efecto estrogénico usando el antiestrógeno puro ICI 182,780, iv) usando el antiestrógeno parcial 4-Hidroxitamoxifen, v) usando las condiciones de cultivo habituales (medio normal) y vi) el vehículo (Etanol absoluto) en el que están solubilizados los fármacos.

La **figura 8** muestra las curvas de proliferación de esta clona generadas de acuerdo al patrón de estimulación establecido.

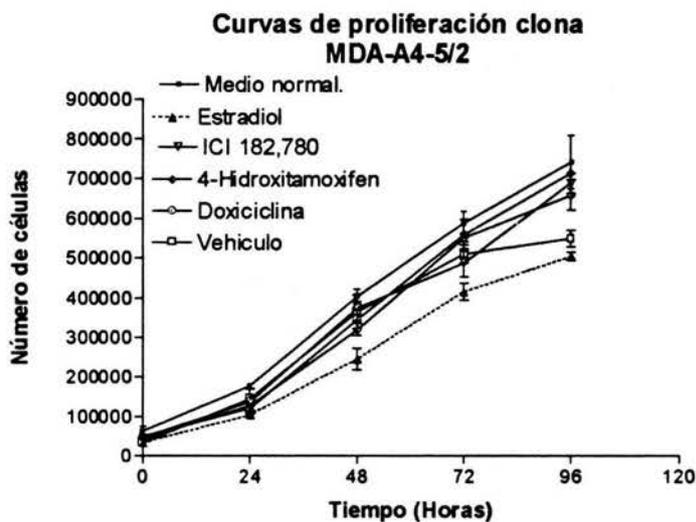


Figura 8. Cinética de proliferación de la línea celular MDA-A4-5/2. El esquema estimulación corresponde al establecido en la tabla 1. Datos de un experimento por triplicado.

Se puede observar que la curva que corresponde al tratamiento solo con E₂ es la de menor proliferación y que los valores mayores corresponden a cuando se cultiva con medio normal y cuando se trata las células con DOX e ICI 182,780.

La **tabla 2** muestra los promedios aritméticos obtenidos de para cada uno de los tratamiento y los tiempos de incubación.

TRATAMIENTO/TIEMPO(hr)	0	24	48	72	96
Medio normal	64±3.3	177±2.0	405±5.7	587±10.0	741±22.0
E ₂	34±1.2	104±3.0	246±9.0	416±7.0	504±34.0
E ₂ + ICI 182,780	47±1.7	137±10.6	376±10.7	488±11.5	688±8.1
E ₂ + 4-hidroxitamoxifen	45±1.6	127±5.0	321±7.5	551±8.1	658±12.0
E ₂ + Doxyciclina	50±1.7	120±3.7	347±7.5	558±13.0	714±20.0
Vehículo	35±1.6	144±9.0	366±8.4	510±7.5	549±7.0

Tabla 2. Promedios aritméticos de las curvas de proliferación en la línea MDA-A4-5/2. Datos obtenidos por cuenta directa en contador de células nucleadas Coulter T-660, datos por triplicado para cada uno de los tiempos (X 10³).

Cuando se realizó el análisis estadístico se encontró que la ANOVA de mediciones repetidas determina diferencias significativas entre los grupos ($p = 0.0015$), y el análisis con la post-prueba de comparaciones múltiples de Tukey arroja diferencias significativas ente los siguientes grupos; Medio Normal vs. Estradiol ($p < 0.001$), Estradiol vs. Estradiol + ICI 182,780 ($p < 0.05$) y Estradiol vs. Estradiol + Doxyciclina ($p < 0.05$). Estos resultados nos dieron indicios que en nuestra línea celular la estimulación estrogénica en presencia del RE α exógeno induce inhibición de la proliferación celular, por lo que para comprobar estos resultados realizamos los ensayos de determinación de fracción celular en fase de síntesis (SPF) por citometría de flujo.

Ensayos de proliferación por fracción celular en fase "S".

Se evaluó la capacidad proliferativa de la línea MDA-A4-5/2, en respuesta a los diferentes tratamientos establecidos en la tabla 1, por medio del establecimiento del porcentaje de células en fase "S" del ciclo celular. En primera instancia se procedió a la estandarización de la técnica de procesamiento y del registro de las mediciones. La **figura 9** muestra algunos de los resultados de esta fase y en ella se observan las gráficas de puntos (izquierda) y los histogramas de DNA generados por las anteriores (derecha) para un ensayo representativo en el que se incluyen: A) Núcleos de eritrocito de pollo (CEN), utilizados para establecer la linealidad del sistema de registro, B) Linfocitos humanos normales, como control de contenido diploide normal de DNA en células humanas. C) Histograma típico de ciclo celular de la línea MDA-MB 231.

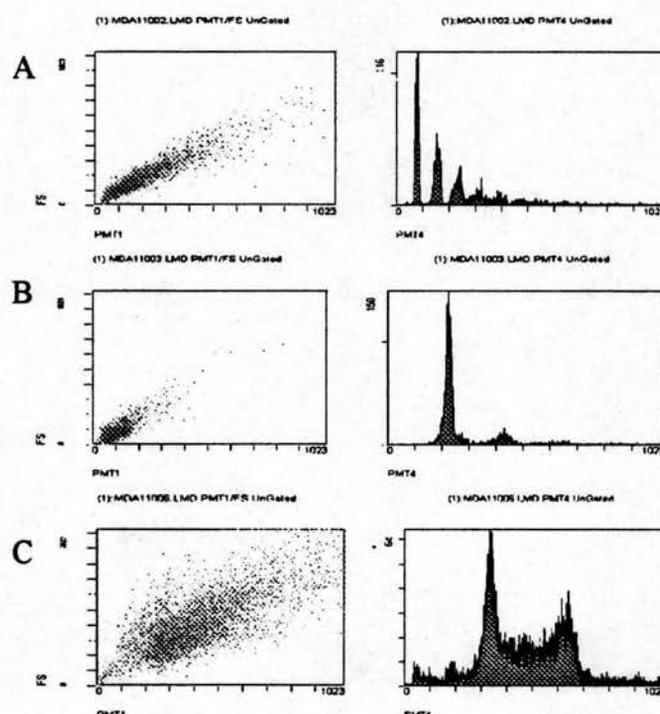


Figura 9. Panel de gráficas correspondientes a la fase de estandarización de los registro de citometría: A) Núcleos de eritrocitos de pollo, indicador de la linealidad del sistema, B) Linfocitos humanos normales, control del contenido diploide de DNA durante la fase G0/G1 en células normales humanas y C) Histograma de ciclo celular típico de la línea MDA-MD 231. La gráfica de puntos de la izquierda muestra la relación entre tamaño y granularidad de los núcleos o de las células y genera el histograma de la derecha a partir de la lectura con el PMT 4 que registra la emisión de PI/DNA.

Posteriormente evaluamos el efecto proliferativo que los tratamientos establecidos en la **tabla 1** tienen sobre la línea celular MDA-A4-5/2. Las gráficas 9-14 muestran los histogramas de ciclo celular para esta línea en las diferentes condiciones de estimulación. Solo se muestran 3 histogramas por tratamiento. El pico principal a la izquierda del histograma corresponde a las fases G_0/G_1 , la región entre los dos picos corresponde a la fase "S" y el pico menor representa el porcentaje de células en fase G_2/M . La generación de los histogramas y los porcentajes de células en las diversas fases del ciclo células fue realizado con el software Multicycle (Phoenix Flow Systems).

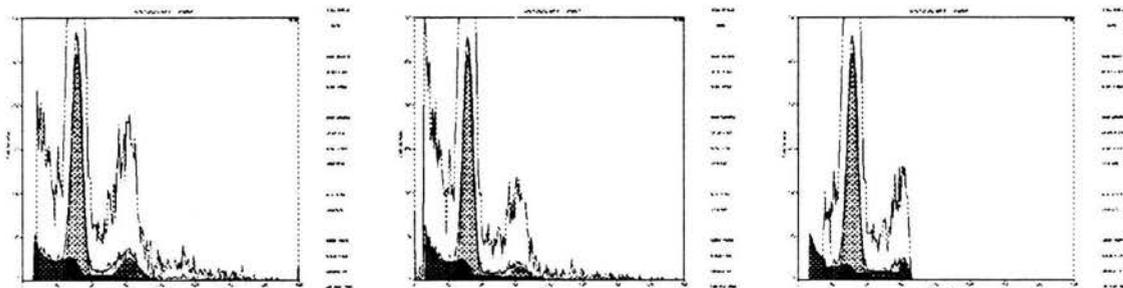


Figura 10. Panel de histogramas de ciclo celular. Estimulación: medio normal.

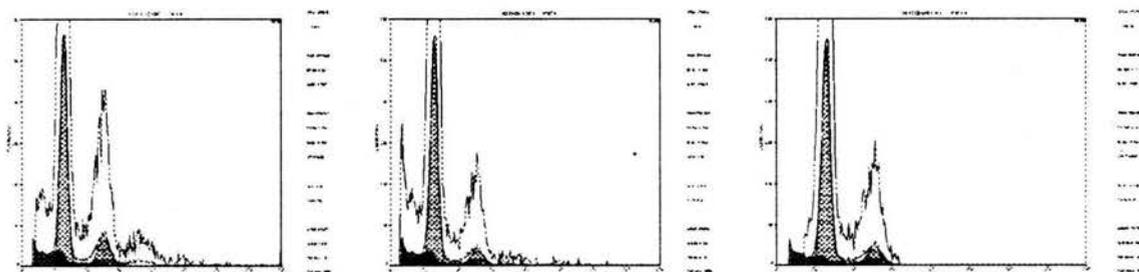


Figura 11. Panel de Histogramas de ciclo celular. Estimulación: E_2 .

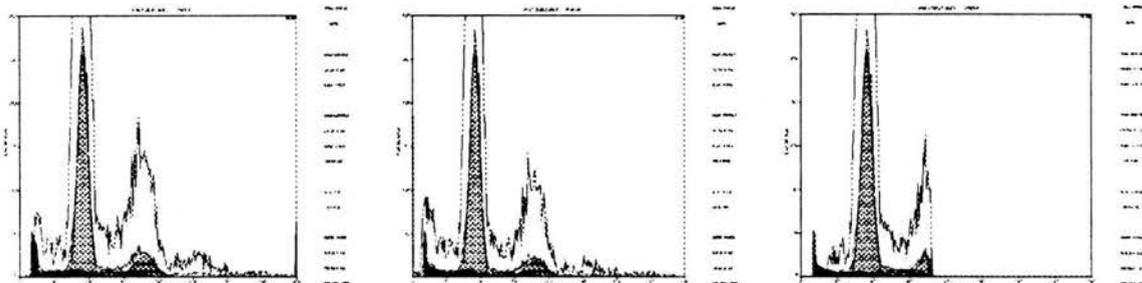


Figura 12. Panel de histogramas de ciclo celular. Estimulación: E₂+ICI 182,780.

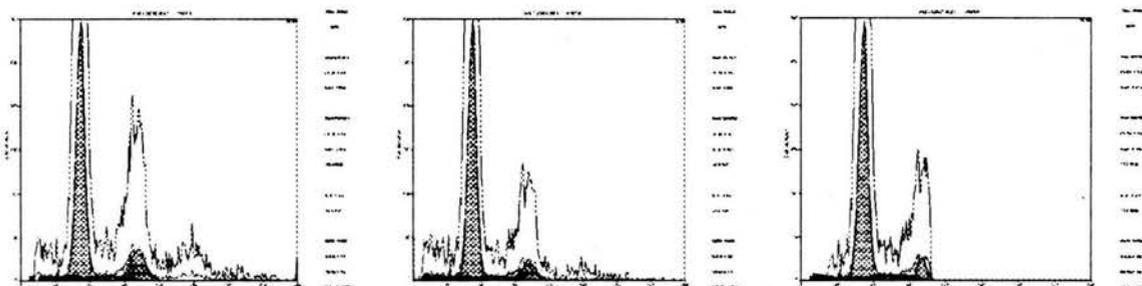


Figura 13. Panel de histogramas de ciclo celular. Estimulación: E₂+TAM.

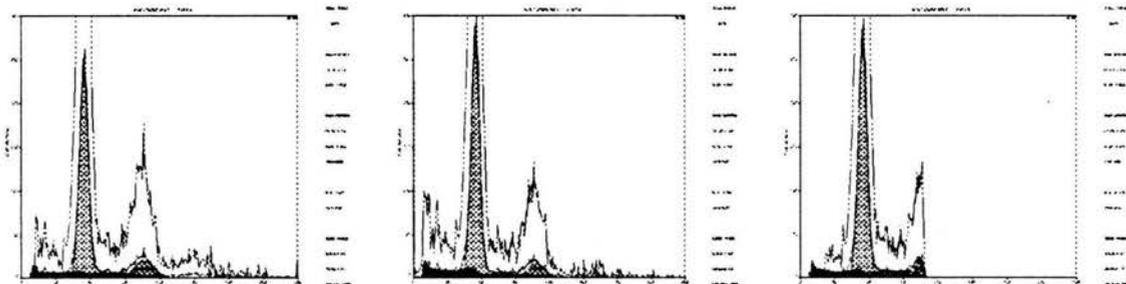


Figura 14. Panel de histogramas de ciclo celular. Estimulación: E₂+DOX.

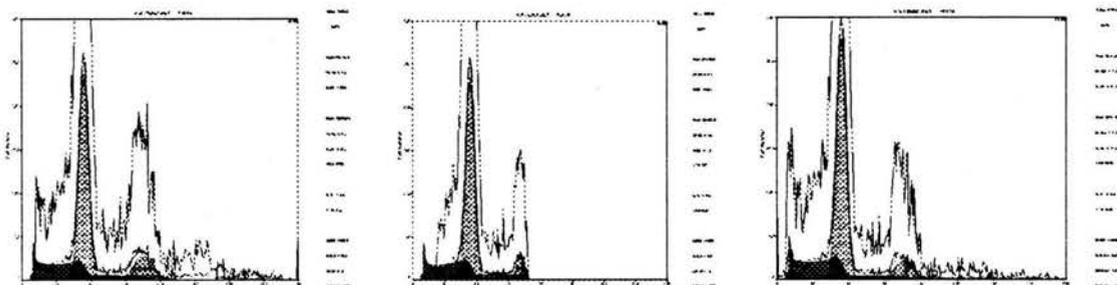


Figura 15. Panel de histogramas de ciclo celular. Estimulación: Vehículo.

Los ensayos de ciclo celular se realizaron en cultivos celulares que se encontraban en la fase exponencial de la curva de crecimiento (fase Log), a un flujo establecido de 60 células/seg., considerando 10,000 células por muestra, el promedio del coeficiente de variación para G₁ fue de 7.6 con un rango de 6.9 a 8.8. La razón G₁/G₂-M se encontró siempre dentro del rango 1.9-2.1

La **tabla 3** muestra los valores promedio del porcentaje de células en fase "S" de la línea MDA-A4-5/2 obtenidos de tres experimentos independientes por triplicado.

% / TX.	Normal	E ₂	E ₂ + ICI 182,780	E ₂ + TAM	E ₂ + DOX	Vehículo
X± SD	8.1 ± 1.3	6.9 ± 1.1	9.7 ± 1.5	8.5 ± 1.1	10.7 ± 1.0	8.8 ± 1.8

Tabla 3. Valores promedio del porcentaje de células en fase "S" de la línea MDA-A4-5/2. Datos obtenidos de tres experimentos independientes por triplicado (n=9).

El análisis estadístico con la prueba de ANOVA de mediciones repetidas determina diferencias significativas ($p < 0.0001$) para los porcentajes de células en fase "S" del ciclo celular y la post-prueba de comparaciones múltiples de Tukey establece que existen diferencias significativas entre: Estradiol vs. ICI 182 780 ($p < 0.001$), Estradiol vs. DOX ($p < 0.001$), estradiol vs. TAM ($p < 0.01$) y estradiol vs. vehículo ($p < 0.05$).

Expresión del gen endógeno del receptor de progesterona en la línea MDA-A4-5/2.

La **figura 16** muestra una banda de 242 pb de DNA amplificado por PCR cuando las células MDA-A4-5/2 fueron cultivadas en ausencia de DOX, mientras que no hay amplificación cuando el antibiótico es adicionado al medio de cultivo. La misma banda fue amplificada en el control de DNA de células MCF-7 tanto en presencia como en ausencia de DOX.

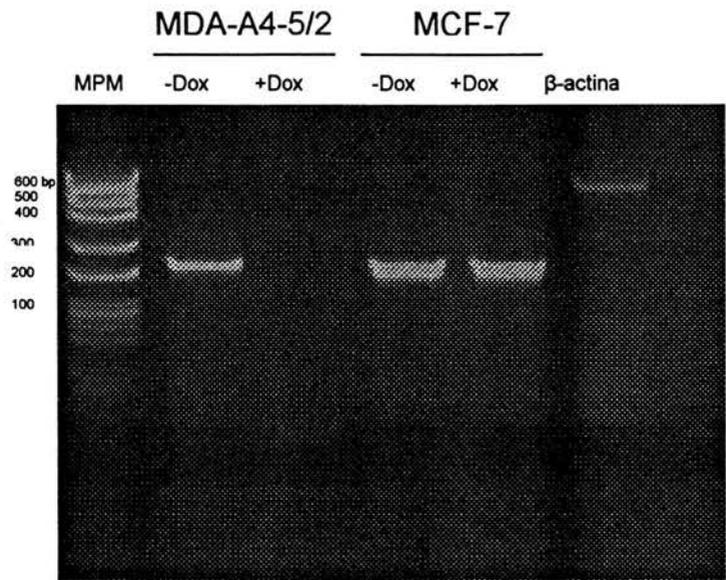


Figura 16. Electroforesis de los productos de RT-PCR para el receptor de progesterona. gel de agarosa 2%. MPM= marcador de peso molecular (100 pb), Dox= doxiciclina.

Discusión.

La expresión de receptores hormonales en cáncer de mama está estrechamente ligada a procesos de proliferación e invasión y determina diferencias fundamentales en la Biología de las células neoplásicas. La expresión o no del RE α pudiera estar relacionado con un mayor o menor grado de dediferenciación celular. Son ampliamente conocidas las diferencias en el curso clínico entre los tumores que expresan el RE α y los que no lo hacen. Los primeros responden mejor a la terapia (quimioterapia y radioterapia), son candidatos a terapia adyuvante con antiestrógenos y en general presentan un fenotipo menos agresivo, los últimos son más agresivos y generalmente la supervivencia de la paciente es menor.

Estas diferencias clínicas ponen de manifiesto diferencias a nivel celular que tienen relación con la expresión de moléculas de respuesta a estímulos externos y/o reguladoras del crecimiento, la proliferación y la adhesión celular. Entre estas moléculas el RE constituye un punto crucial en los procesos de regulación y amplificación de la respuesta a diversos estímulos ya que además de regular la respuesta a estimulación estrogénica, también se involucra en los procesos celulares inducidos por algunos factores de crecimiento (**Curtis 1996, Clayton 1997, Ignar-Trowbridge 96, Mohamood 1997, Kahler 2000, Klotz 2000**), protooncogenes nucleares (**Mohamood 1997**), AMPc (**Aronica 1994, El-Tanani 1996**) y dopamina (**Power 1991, Smith 1993**), aparte de que eventualmente regula la expresión de estos elementos, por lo que podría considerarse que funciona como una molécula "maestra" dentro de la fisiología de las células estrógeno-dependientes (**Levenson 1994**).

Un hallazgo experimental en este sentido ha sido la observación de que la reexpresión del RE α en las líneas celulares de cáncer de mama RE- correlaciona con la disminución de la capacidad proliferativa de este tipo de células, sin embargo los modelos usados en estos ensayos no presentaban las características

necesarias que permitieran asumir estos resultados como concluyentes (**Levenson 1994**). Es por esto que el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto proliferativo que la estimulación estrogénica tiene sobre una línea celular de cáncer de mama humano RE α negativa, en la que es posible regular la expresión de este receptor transfectado en forma estable.

Para esto primeramente desarrollamos y caracterizamos el modelo celular que presenta las características que nos permitieran dilucidar este fenómeno.

Por esta razón usamos la línea celular de cáncer de mama humano denominada MDA-MB 231 que no expresa en RE α endógeno, para transfectarle establemente el gen HEGO previamente clonado en el sistema de regulación de la expresión genética de Gossen y Bujard (Tet-Off System, Clontech) el cual es dependiente de tetraciclina y sus derivados, que ha sido usado con éxito para regular la expresión de diversos productos proteicos como las ciclinas D1 y E en fibroblastos de rata (**Resnizky 1994**), TGF- β en cultivo primario de queratinocitos humanos y en una línea celular de epitelio pulmonar humano (**Wettergreen 2001**), interleucina-2 en células de melanoma humano (**Pitzer 1999**) y del receptor a glucocorticoides en la línea de fibroblastos de ratón L-929 (**Wei 1998**).

Después de dos transfecciones estables en las que se introdujeron en las células los componentes del sistema de regulación de la expresión genética, previa clonación del gen HEGO en el operador del sistema, obtuvimos una clona celular que expresa de manera regulable en RE α . La funcionalidad del sistema celular la comprobamos con el uso de genes reporteros que nos indican la capacidad de regulación de la expresión de este gen en nuestra línea celular. El uso de este sistema nos permitió regular la expresión del RE α en el rango de 0 a 10 $\mu\text{g/ml}$, desde una expresión máxima hasta abolir la expresión del gen, respectivamente. Esta característica del sistema de regulación de Gossen y Bujard, aunada a que la línea celular MDA-MB 231 no expresa en gen endógeno que codifica para el RE α , es la que nos permitió usar la línea MDA-A4-5/2 para evaluar el efecto

proliferativo que los estrógenos ejercen sobre células en las que se ha re-expresado este receptor.

Por otro lado los ensayos de unión hormona-receptor que nos demuestran que con 10 $\mu\text{g/ml}$ de DOX es posible inhibir totalmente la expresión del $\text{RE}\alpha$ en la línea celular MDA-A4-5/2 y que las constantes de disociación del $\text{RE}\alpha$ transfectado está dentro del rango nanomolar, que corresponde a la afinidad reportada para el complejo $\text{RE}\alpha$ -Estradiol tanto en condiciones de expresión endógena como en los casos de transfección del receptor (**Levenson 1994**). Además en cuanto a los niveles de expresión, en condiciones fisiológicas la expresión del $\text{RE}\alpha$ en células estrógeno-dependientes presenta un rango de variación amplio que va de 10,000 a 100,000 receptores/célula (**Landers 92**) y en nuestra línea celular, en condiciones de libre expresión del receptor (sin DOX), los niveles están próximos a 20,000 moléculas por célula, Con estos resultados, en principio podemos asumir que, teóricamente, el nivel de expresión del $\text{RE}\alpha$ en estas condiciones de cultivo, corresponde a niveles fisiológicos apropiados y que cuando se bloquea la expresión, usando 10 $\mu\text{g/ml}$ de DOX, no se observa en niveles significativos

Posteriormente procedimos a realizar las curvas de proliferación de nuestra clona para determinar si por cuenta directa obteníamos evidencia de modificaciones en las cinéticas de crecimiento de acuerdo a la expresión o no del $\text{RE}\alpha$. Este método ha sido utilizado en varios trabajos para hacer evaluaciones de proliferación celular in vitro en células de cáncer de mama (**Mur 1998, Prakash 2001**). Asimismo, para observar si este efecto estaba mediado por el receptor, bloqueamos el efecto estrogénico con ICI 182,780 y TAM.

Las cinéticas de proliferación de la línea MDA-A4-5/2 nos muestran gráficamente que el tratamiento con E_2 (10^{-8} M) corresponde a la curva de menor proliferación y los mayores valores se obtienen cuando cultivamos en medio normal y cuando tratamos con ICI 182,780 (10^{-8} M) y DOX (10 $\mu\text{g/ml}$).

El análisis estadístico de las curvas de proliferación de la línea MDA-A4-5/2 indica que, cuando es tratada solo con E₂ (expresión del RE), las cuentas celulares son significativamente menores que cuando se cultiva en el medio normal (p<0.001) y cuando las células se incuban en presencia de E₂ + ICI 182,780 (bloqueo del efecto estrogénico, p< 0.05) y E₂+ DOX (No expresión del RE, p<0.05). Esto nos demostró, en principio, que el efecto estrogénico en nuestra línea celular provoca una reducción de la proliferación y que este efecto es bloqueado por el antiestrógeno puro ICI 182,780, sin embargo debemos mencionar que no se observa ningún efecto cuando se usa TAM. Eso probablemente se deba a que la dispersión en nuestra cuenta celular es muy amplia.

El siguiente paso fue corroborar estos resultados a través del análisis de ciclo celular y el porcentaje de células en fase "S" en nuestra línea, para ello establecimos el mismo patrón de estimulación y evaluamos por citometría de flujo la fracción celular en fase de síntesis.

El porcentaje de células en fase "S" del ciclo celular ha sido establecido como un indicador confiable de proliferación celular en cáncer de mama en múltiples estudios, en donde se demuestra una correlación significativa con algunos marcadores de proliferación celular como Ki67 (**Vielh 1990, Isola 1989**), Ki67 y el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) (**Dawson 1990**), con Ki67, MIB1 y con la cuenta de figuras mitóticas (**Keshgegian 1995**) y PCNA (**Visscher 1992**). También se ha encontrado que la fracción celular en fase "S" tiene valor pronóstico en cáncer de mama (**Kallioniemi 1988, Visscher 1990**). Finalmente ha sido establecido como un parámetro independiente indicador de proliferación celular en mama (**Bhalla 2000**).

El análisis se realizó en los histogramas del ciclo celular de la línea MDA-A4-5/2. Estos histogramas son generados por el programa de análisis Multicycle que realiza iteraciones sucesivas para encontrar el histograma de mejor ajuste (región sombreada) a los datos generados por el citómetro. El programa proporciona los siguientes datos; % de células en fase G_{0/1} y su coeficiente de variación (CV)

asociado, % de células en fase de síntesis "S", % de células en fase G_2/M y la razón de las lecturas para $G_{0/1}/G_{2M}$.

El análisis estadístico indica que los valores obtenidos cuando se expresa el $RE\alpha$ (E_2) son significativamente menores que cuando no se expresa el receptor (DOX) ($p < 0.001$), lo mismo ocurren cuando se bloquea el efecto estrogénico con ICI 182,780 ($p < 0.001$) y con TAM ($p < 0.01$).

Este fenómeno ya ha sido observado por otros autores, Por ejemplo **Zajchowski** y colaboradores (1993) reportan que cuando reexpresan el $RE\alpha$, por transfección estable, en una línea epitelial no-tumorigénica de mama humana y en dos líneas de cáncer de mama humano (21T y MDA-MB 231) se observa una disminución de la proliferación en respuesta a estimulación estrogénica y que este efecto inhibitor es bloqueado por ICI 164,384, pero no por TAM. Contrariamente, **Lazenec** y colaboradores (1999) cuando reexpresaron el $RE\alpha$ en células MDA-MB 231, por medio de un sistema de infección por adenovirus, observaron que el tratamiento con E_2 e ICI 164,384 inhibe la proliferación celular y que el TAM no tiene ningún efecto en proliferación, pero si es capaz de bloquear el efecto inhibitor de los E_2 y del ICI 164,384.

Estas diferencias podrían reflejar diferencias en la naturaleza misma de los antiestrógenos ya que se sabe que los antiestrógenos de tipo I, actualmente denominados Moduladores Selectivos del Receptor de Estrógenos (MSRE) entre los que se incluye el TAM, pueden actuar como agonistas o antagonistas del efecto estrogénico dependiendo del contexto celular y del elemento de respuesta sobre el que actúa el complejo RE-antiestrógeno. Por otro lado los antiestrógenos del tipo II o antagonistas puros, entre los que se encuentra el ICI 182,780 siempre ejercen efectos antagonistas (**Barrón 2001**).

Esto explicaría parcialmente la falta de efecto del TAM pero no dice nada sobre la inhibición de la proliferación inducida por ICI 164,384 que encuentran Lazenec y

sus colaboradores en su sistema celular, aquí tendríamos que considerar las características propias de cada sistema celular, así como los niveles de expresión del receptor y la eficiencia con que la reexpresión de este receptor recrea el fenotipo estrógeno-dependiente, para lo cual se tendría que demostrar la expresión de genes endógenos de respuesta a estimulación estrogénica (vg. gen del receptor a progesterona, del factor de crecimiento epidermal y su receptor, c-myc, c-fos, c-jun, pS2) que son activados en cada sistema celular.

Los estudios que existen en este sentido no han arrojado resultados que aclaren este panorama, ya que como se ha visto en células MDA-MD 231 transfectadas con el gen HEGO aun cuando se observa que las células transfectadas regulan sus factores de crecimiento, en respuesta a estimulación estrogénica, de la misma manera que las células RE+, el efecto final es la inhibición de la proliferación celular y no una promoción de la misma (**Jeng 1994, Zajchowski 1991**). Esto ha llevado a pensar a algunos investigadores que el RE transfectado no necesariamente es equivalente, funcionalmente hablando, al RE endógeno (**Watts 1994**).

Esta apreciación se ve reforzada por los resultados del trabajo de Lazenec y sus colaboradores que indican que el RE exógeno se expresa de manera adecuada, con afinidad por el ligando y un patrón de activación de genes reporteros similar al mostrado por el RE α endógeno expresado en células MCF7. Incluso demuestran la inducción por E₂ de pS2, un gen regulado por estrógenos y que se considera como un marcador pronostico favorable para terapia endocrina en cáncer de mama RE+. En este modelo la sola expresión del RE α no tiene efecto sobre la proliferación, pero el tratamiento con E₂ o con el antiestrógeno puro ICI-164,384 suprime la proliferación, mientras que el tratamiento con el antiestrógeno parcial 4-hidroxitamoxifen no tiene efecto sobre la proliferación, pero si es capaz de bloquear el efecto inhibitor de los E₂ y del ICI-164 384. Estos autores también demuestran que la estimulación con E₂ inhibe fuertemente la expresión del protoocogen c-myc y también la de los genes BRCA1 y 2 lo cual es congruente

con el papel inductor de proliferación que tienen estos genes y explicaría en parte la inhibición de la proliferación celular inducida por los E₂ (Lazenec 1999).

Nuestros datos de fracción celular en fase de síntesis corroboran los resultados obtenidos en la cuenta celular directa y nos proporcionan evidencia de que en nuestra línea celular, y en nuestras condiciones experimentales, el efecto estrogénico mediado por el RE α induce una disminución de la proliferación y que este efecto inhibitor se realiza a través de este receptor, ya que es revertido cuando se bloquea la acción estrogénica con el antiestrógeno puro ICI 182,780 y con el antiestrógeno parcial 4-hidroxitamoxifen (TAM).

Finalmente demostramos que en nuestro modelo celular la estimulación estrogénica mediada por el RE α exógeno induce la expresión del gen del receptor de progesterona, el cual se sabe que es inducido transcripcionalmente por los E₂ en condiciones celulares normales en el tejido mamario. Este hallazgo presenta dos vertientes interesantes; primero muestra que la línea celular parental, MDA-MB 231 cuenta con la maquinaria transcripcional necesaria y suficiente para responder al estímulo estrogénico de manera adecuada o "normal" y segundo que la estimulación con E₂, mediada por la re-expresión de un RE α ectópico de manera estable, es capaz de inducir aunque sea solo parcialmente un fenotipo hormono-dependiente. Ambos hechos representan amplias posibilidades tanto para el entendimiento de la fisiología de los tumores de mama, como posibilidad terapéutica para esta patología. Si consideramos que la malignización de una estirpe celular implica un proceso gradual de desdiferenciación, que en el caso del cáncer de mama parece estar directamente asociado a la expresión de receptores hormonales y en esta medida también a un fenotipo más agresivo, entonces la re-expresión del RE α en nuestra línea celular parece implicar el "regreso" a un fenotipo mas diferenciado y por lo tanto, menos proliferativo.

Conclusiones.

1. Desarrollamos de una línea celular de cáncer de mama humano en la que es posible regular la expresión del RE α partiendo de una línea celular que no expresa este receptor, para ello usamos el sistema de regulación de la expresión genética dependiente de tetraciclina de Gossen y Bujard.
2. Esta línea celular muestra niveles de expresión del RE α apropiados, tanto en cantidad, como en capacidad de unión a DNA, así como en eficacia como factor de transcripción.
3. Demostramos por cuenta celular y por fracción celular en fase "S" que en estas condiciones la estimulación estrogénica induce una disminución significativa de la proliferación celular.
4. Demostramos que este efecto inhibitor de la proliferación esta mediado por el RE α , ya que la adición de antiestrógenos lo revierte.
5. Finalmente demostramos que, en nuestras condiciones, la re-expresión del RE α induce la expresión del gen endógeno a progesterona y por lo tanto recrea un fenotipo estrógeno-dependiente, al menos parcialmente.

Referencias.

Alberg A, Singh S, May J, Helzlsouer K. Epidemiology, prevention and early detection of breast cancer. *Curr Op Oncology* 12: 515-520, 2000.

Aronica S, Kraus W, Katzenellenbogen B. Estrogen action via the cAMP signaling pathway: Stimulation of adenilate cyclase and cAMP-regulated gene transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* 91;8517-21, 1994

Arrick B, Korc M, Derynck R. Differential regulation of expression of three transforming growth factor beta species in human breast cancer cell lines by estradiol. *Cancer Res* 50: 299-303, 1990.

Ausubel F, Brent R, Kingston R, Moore D, Seidman J, Smith J, Struhl K. *Current protocols in Molecular Biology*. John Willey and sons Inc, 1997. USA.

Barrón A, Arias J, Castro I. Antiestrógenos; Mecanismo de acción y aplicaciones clínicas. *Salud Pú. Méx.* 43; 577-584, 2001.

Barrón A, Bermejo L, Castro I. El receptor de estrógenos y la glándula mamaria. *Rev Invest Clin* 49; 515-528, 1997.

Beato M, Klug J. Steroid hormone receptors: an update. *Hum Reprod Update* 6: 225-236, 2000.

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

Bhalla V, Loshi K, Vohra H, Singh G, Ganguly N. Effect of growth factors on proliferation of normal, Borderline, and malignant breast epithelial cells. *Exp Mol Pathol* 68; 124-132, 2000.

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 Submicroscr Cytol Pathol* 26; 147-162. 1994

Brasier A, Ron D. Luciferase reporter gene assay in mammalian cells. *Methods in Enzimology* 216: 386-397. 1992.

Breast Cancer Research Source, American Cancer Society, 2000.
www.cancer.org

Butler M. Mammalian cell biotechnology; A practical approach. Oxford University Press, USA, 1991.

Camacho I, Pasapera A, Cerbón M. Regulation of progesterone receptor gene expression by sex hormones in the hypothalamus and the cerebral cortex of the rabbit. *Neuroscience Lett* 214; 25-28, 1996.

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; 3131-3135, 1985.

Chambraud B, Berry M, Redehuilh 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; 20686-20691, 1990.

Chomczynsky P, Sacchi N. Single-step method for RNA isolation by acid guanidine thiocyanate-phenol-chloroform extractions. *Anal Biochem* 162; 156-159, 1987.

Ciocca D, Vargas-Roig L. Estrogen receptors in non target tissues: Biological and clinical implications. *Endocrine Rev* 16: 35-62, 1995.

Clayton S, May F, Westley B. Insulin-Like growth factor control the regulation of oestrogen and progesterone receptor expression by oestrogens. *Mol Cell Endocrinol* 128; 57-68, 1997.

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: 316-320, 1996.

Coleman K, Smith C. Intracellular signaling pathways: nongenomic actions of estrogens and ligand independent activation of estrogen receptors. *Frontiers BioSci* 6: d1379-391, 2001.

Curtis S, Washburn T, Sewall C, DiAugustine R, Lindzey J, Couse J, Korach K. Physiological coupling of growth factor and steroid receptor signalling pathways:

estrogen receptor Knock-out mice lack estrogen -like response to epidermal growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 93; 12626-12630, 1996.

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; 232-240, 1993.

Dauvois S, White R, Parker M. The antiestrogen ICI 182780 disrupts estrogen receptor nucleocytoplasmic shuttling. *J Cell Sci* 106; 1377-1388, 1993.

Dawson A, Norton J, Wiernberg D. Comparative assessment of proliferation and DNA content in breast carcinomas by image analysis and flow cytometry. *Am J Pathol* 136; 1115-1124, 1990.

Denton R, Koszewski N, Notides A. Estrogen receptor phosphorylation: hormonal dependence and consequence on DNA binding. *J Biol Chem* 267; 7263-7268, 1992.

Dickson R, Lippman M. Estrogen regulation of growth and polypeptide growth factor secretion in human breast carcinoma. *Endocr Rev* 8: 29-43, 1987.

Eisen A, Weber B. Recent advances in breast cancer biology. *Curr Op Oncol* 10; 486-491, 1998.

Ellisen L, Haber D. Hereditary breast cancer. *Annu Rev Med* 49: 425-436, 1998.

El-Tanani M, Green C. Interaction between estradiol and AMPc in the regulation of specific gene expression. *Mol Cell Endocrinol* 124; 71-77. 1996.

Enmark E, Gustafsson JA. Oestrogen receptors- an overview. *J Intern Med.* 246; 133-138, 1999.

Enmark E, Pelto-Huikko M, Grandien K, Lagercrantz S, Lagercrantz J, Freid G, Nordenskjold M, Gustafsson JA. Human estrogen receptor β gene structure, chromosomal localization and expression pattern. *J Clin Endocrinol Metab* 82; 4258-4265, 1997.

Fawell S, Lees J, White R, Parker M. Characterization and colocalization of steroid binding and dimerization activities in the mouse estrogen receptor. *Cell* 60: 953-962. 1990.

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: 2279-2283, 1995.

Ferrero M, Cairo G. Estrogen-regulated expression of a growth arrest specific gene (gas1) in rat uterus. *Cell Biol Int* 17; 857-862. 1993

Freshney R. Culture of animal cells: A manual of basic techniques. Willey-Liss, 2nd. Ed., USA, 1991.

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.

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 tumours. *Cancer Res* 52; 483-86. 1992.

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; 105-109, 1991.

Gaben A, Mester J. BALB-C mouse 3T3 fibroblast expressing human estrogen receptor: Effect of estradiol on cell growth. *Biochem Biophys Res Commun* 176: 1473-1481, 1991.

García A, García J, Martínez A, Del Rio B, Lazo P, Ramos S. Melatonin blocks the activation of estrogen receptor for DNA binding. *FASEB J* 13; 857-868, 1999.

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; 11538-11542, 1992.

Gaub M, Bellard M, Scheuer I, Cambon P, Sassone-Gorsi P. Activation of the ovalbumin gene by the estrogen receptor involves the fos-jun complex. *Cell* 63:1267-1276, 1990.

Gee A, Carlson K, Martini P, Katzenellenbogen B, Katzenellenbogen J. Coactivator peptides have a differential stabilizing effect on the binding of estrogens and antiestrogens with the estrogen receptor. *Mol Endocrinol* 13; 1912-1923, 1999.

Going J, Anderson J, Battersby S, MacIntire A. Proliferation and secretory activity in human breast during natural and artificial menstrual cycles. *Am J Pathol* 130; 193-198, 1988.

González G, Ondarza R, Gamboa A, Cerbón M, Camacho I. Progesterone receptor isoforms expression pattern in human astrocytomas. *Brain Res Bull* 56; 43-48, 2001

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.

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.

Gossen M, Bujard H. Tight control of gene expression in mammalian cell by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci USA*. 89: 5547-5551, 1992

Gossen M, Freundlieb S, Bender G, Muller G, Hillen W, Bujard H. Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science* 268: 1766-1769, 1995

Gray T, Flynn T, Gray K, Nabell L. 17beta-estradiol acts directly on the clonal osteoblastic cells line UMR 106. *Proc Natn Acad Sci USA* 84: 6267-6271, 1987.

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

Greene G, Gilna P, Waterfield M, Baker A, Hort Y, Shine J. Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA. *Science* 231; 1150-1152, 1986.

Guichon-Mantel A, Lescop P, Chrstin-Maitre S, Loosfelt H, Perrot-Applanat M, Milgrom E. Nucleocytoplasmic shuttling of the progesterone receptor. *EMBO J* 10; 3851-3859, 1991.

Gustafsson JA. An update on estrogen receptors. *Semin Perinatol* 24; 66-69, 2000.

Guyton A. *Tratado de fisiología medica*. 8a. De. Interamericana-McGraw-Hil, México, 1992.

Hall J, McDonnell D. The estrogen receptor β isoform of the human estrogen receptor modulates ER α transcriptional activity and is key regulator of the cellular response to estrogens and antiestrogens. *Endocrinology* 140; 5566-5578, 1999.

Hankinson S, Stampfer J. Estrogen and breast cancer. *Salud Pub Mex* 39; 370-378, 1997.

Henderson B, Rose R, Pike M, Casagrande J. Endogenous hormones as a major factor in human cancer. *Cancer Res* 43; 3232-3239, 1982.

Henderson B, Ross R, Bernstein L. Estrogens as a cause of human cancer: the Richard and Linda Rosenthal foundation award lecture. *Cancer Res* 48: 246-253, 1988.

Henderson B, Spencer H. Hormonal carcinogenesis. *Carcinogenesis* 21: 427-433, 2000.

Hill A, Doyle J, McDermott E, O'Higgins N. Hereditary breast cancer. *British J Cancer* 84: 1334-1339, 1997.

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.

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.

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: 5585-5588, 1993.

Hyder S, Loose-Mitchell D, Stancel G. The protooncogene c-jun contains an unusual estrogen inducible enhancer within the coding sequence. *JBC* 270; 8506-8513, 1995.

Hyder S, Stancel G, Loose-Mitchell D. Presence of an estradiol response region in the mouse c-fos oncogene. *Steroids* 56: 498-504, 1991.

Hyder S, Stancel G. In vitro interaction of the uterine estrogen receptor with the estrogen response element present in the 3'-flanking region of the murine c-fos protooncogene. *J Steroid Biochem Molec Biol.* 48: 69-79, 1994.

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: 1735-1744, 1996.

International agency for cancer research, 2001. www.iarc.fr

Isola J, Helin H, Markku J, Helle J, Kallioniemi O. Evaluation of cell proliferation in breast carcinoma. *Cancer* 65; 1180-1184, 1990.

Iwase H, Omoto Y, Iwata H, Hra Y, Ando Y, Kobayash S. Genetic and epigenetic alterations of the estrogen receptor gene and hormone independence in human breast cancer. *Oncology* 55(suppl I); 11-16, 1998.

Jeng M, Jiang H, Jordan C. Paradoxical regulation of estrogen-dependent growth factor expression in estrogen receptor negative human breast cancer cells stably expressing ER. *Cancer Lett* 82: 123-128, 1994.

Jensen EV, Jacobson HI. Basic guides to the mechanisms of estrogen action. *Recent Prog Horm Res*18; 387-414, 1962.

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; 632-638, 1968.

Jiang S, Jordan C. Growth regulation of estrogen receptor negative breast cancer cells transfected with complementary DNA's for estrogen receptor. *J Natn Cancer Inst* 84: 580-591, 1992.

Kahler S, Nuedling S, Eickels M, Vetter H, Meyer R, Grohe C. Estrogen receptor α rapidly activates the IGF-1 receptor pathway. *J Biol Chem* 275; 18447-18453, 2000.

Kallioniemi O, Blanco G, Alavaiko M, Hietanen T, Mattila J, Lauslati K, Lehtinen M, Koivula T. Improving the prognostic value of DNA flow cytometry in breast cancer by combining DNA index and S-phase fraction. *Cancer* 62; 2183-2190, 1988.

Kaneko K, Gelinas C, Gorski J. Activation of the silent progesterone receptor gene by ectopic expression of estrogen receptors in a rat fibroblast cell line. *Biochemistry* 32: 8348-8359, 1993.

Kasid A, Davidson N, Gelmann E, Lippman M. transcriptional control of thymidine kinase gene expression by estrogens and antiestrogens in MCF7 human breast cancer cells. *J Biol Chem* 261: 5562-5567, 1986.

Katzenellenbogen B, Elliston J, Monsma F, Springer P, Ziegler Y, Greene G. Structural analysis of covalently labelled estrogen receptor by limited proteolysis and monoclonal antibody reactivity. *Biochemistry* 26, 2364-2373, 1987.

Katzenellenbogen B. Dynamics of steroid hormone receptor action. *Annu Rev Physiol.* 42; 17-25, 1980.

Kaye A, Wiesman Y, Arel A, Somjen D. Hormonal stimulation of bone cell proliferation. *J Steroid Biochem Mol Biol* 37: 431-435, 1990.

Keshegian A, Cnaan A. Proliferation markers in breast carcinoma. *Am J Clin Pathol* 104; 42-49, 1995.

Kholer M, Berkholz 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.

Kiuper G, Brinkmann A. Steroid hormone receptor phosphorylation: is there a physical role? *Mol Cell Endocrinol* 100; 103-107, 1994.

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: 647-653, 1988.

Klotz D, Curtis S, Korach K, DiAugustine R. Activation of a uterine insulin-like growth factor signalling pathway by clinical and environmental estrogens: requirement of estrogen receptor α . *Endocrinology* 141; 3430-3439, 2000.

Knabbe C, Lippman M, Wakefield L, Flanders K, Kasid A, Derynck R, Dickson R. Evidence that transforming growth factor β is a hormonally regulated negative growth factor in human breast cancer cells. *Cell* 48: 417-428, 1987.

Konishi N, Nakaoka S, Hiasa Y, Kitahori Y, Ohshima M, Samma S, Okajima E. Immunohistochemical evaluation of estrogen receptor status in benign prostatic hypertrophy and the prostate carcinoma and the relationship to efficacy of endocrine treatment. *Oncology* 50; 259-263, 1993.

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; 891-897, 1986.

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; 2231-2236, 1989.

Kushner J, Hort E, Shine J, Baxter J, Greene G. Construction of cells lines that express high levels of human estrogen receptor and are killed by estrogens. *Mol Endocrinol* 4: 1465-1473, 1990.

Lachelin GC. Introduction to clinical reproductive endocrinology. Butterworth-Heinemann. London, 1991.

Lahooti H, White R, Danielian P, Parker M. Characterization of ligand-dependent phosphorylation of the estrogen receptor. *Mol Endocrinol* 88; 182-188, 1994.

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.

Lapidus R. Methylation of estrogen receptor and progesterone receptor gene 5' CpG islands correlates with lack of estrogen as progesterone receptor gene expression in breast tumours. *Clin Cancer Res* 2; 805-810, 1997.

Lau C, Subramaniam M, Rasmussen K, Spelsberg T. Rapid inhibition of the c-jun protooncogene expression in avian oviduct by estrogen. *Endocrinology* 127: 2595-2597, 1990.

Lazenec G, Katzenellenbogen B. Expression of human estrogen receptor using a efficient adenoviral gene delivery system is able to restore hormone-dependent features to estrogen receptor-negative breast carcinoma cells. *Mol Cell Endocrinol* 149; 93-105, 1999.

Le Goff P, Montano M, Schodin D, Katzenellenbogen B. Phosphorylation of the human estrogen receptor: identification of hormone-regulated and examination oh their influence on transcripcional activity. *J Biol Chem* 269; 4458-4466, 1994.

Levenson A, Craig Jordan V. Transfection of human estrogen receptor (ER) cDNA into ER-negative mammalian cell lines. *J Steroid Biochem Molec Biol* 51, 229-239, 1994.

Liehr J. Is estradiol a genotoxic mutagenic carcinogen? *Endocrine Rev* 21: 40-54, 2000.

Lingham R, Stancel G, Loose-Mitchell D. Estrogen induction of epidermal growth factor receptor mRNA. *Mol Endocrinol* 2: 230-235, 1988.

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: 910-918, 1994.

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.

Marchand D. Risk factors. *Obstet Gynecol Clin Nort Am* 21; 561-586, 1994.

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* 761:121-137, 1995.

Mcguirre L. Hormone receptors in breast cancer. In *Cancer surveys*. Bulbrook RD (Ed.) Oxford Univ Press, Oxford. Vol. 5; 527-536, 1986.

Menasce P, White R, Harrisson J, Boyle M. Localization of the estrogen receptor locus (ESR) to chromosome 6q25.1 by FISH and a simple post-FISH technique. *Genomics* 17; 263-265, 1993.

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; 2617-2624, 1992.

Mohamood A, Gyles P, Balan K, Hollis V, Eckberg W, Asseffa A, Han Z, Wyche J, Anderson W. Estrogen receptor, growth factor receptor and protooncogene protein activities and possible signal transduction crosstalk in estrogen dependent and independent cancer cell lines. *J Submicr Cytol Pathoi* 29; 1-17, 1997.

Montano M, Ekena K, Delage R, Chang W, Martini P, Katzenellenbogen B. An estrogen receptor-selective coregulator that potentiates the effectiveness of

antiestrogens and represses the activity of estrogens. *Proc Natl Acad Sci USA* 96; 6947-6952, 1999.

Montano M, Muller A, Trobaugh A, Katzenellenbogen B. The carbox-terminal F domain of the human estrogen receptor: role in the transcriptional activity of the receptor and the effectiveness of antiestrogens as estrogens antagonist. *Mol Endocrinol* 9: 814-825, 1995.

Moore J, Mckee D, Slentz-kesler K, Moore L, Jones S, Horne E, Su J, Kliewer S, Lehmann J, Wilson T. Cloning and characterization of human estrogen receptor β isoforms. *Biochem Biophys Res Commun* 247; 75-78, 1998.

Mosselman S, Polman J, Dijkema R. ER β : Identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Lett* 392; 49-53, 1996.

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.

Mur C, Martínez P, Fernandez M, Ramon J, Rosel P, Navarro M. Growth of MDA-MB 231 cell line; different effects of TGF- β_1 , EGF and estradiol depending on the length of exposure. *Cell Biol Int* 22; 679-684, 1998.

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.

Nakshatri H, Bhat- Nakshatri P, Martin D, Goulet R, Sledge G. Constitutive activation of NF- κ B during progression of breast cancer to hormone-independent growth. *Mol Cell Biol* 17; 3629-39, 1997.

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.

Nephew K, Tang M, Khan S. Estrogen differentially affects c-jun expression in uterine tissue compartments. *Endocrinology*134:1827-34. 1994.

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.

Ogawa S, Inoue S, Orimo A, Hosoi T, Ouchi Y, Muramatsu M. Cross-inhibition of both estrogen receptor α and β pathways by each dominant negative mutant. *FEBS Lett* 423;129-32, 1998.

Oñate S, Tsay S, Tsay M, O'Malley B. Sequence and characterisation of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily. *Science* 270:1354-57, 1995.

Orti E, Bodwell J, Munk A. Phosphorylation of steroid hormone receptors. *Endocrine Rev* 13;105-28, 1992.

Parker M, Arbuckle N; Dauvois P, Danielian P; White R. Structure and function of the estrogen receptor. *Ann NY Acad Sci.* 684;119-26. 1993.

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

Peterson K, Grandien K, Kuiper G, Gustafsson J. Mouse estrogen receptor β forms estrogen response element-binding heterodimers with estrogen receptor α . *Mol endocrinol* 11;1486-96, 1997.

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.

Pitzer C, Schindowski K, Power S, Wirth T, Zoller M. In vivo manipulation of interleukin-2 expression by a retroviral tetracycline (tet)-regulated system. *Cancer Gene Ther* 6; 139-146, 1999.

Powell C, Soto A, Sonnenschein C. Identification and characterization of membrane estrogen receptor from MCF7 estrogen target cells. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 77:97-108, 2001.

Power R, Mani S, Codina J, Connely O, O'Malley B. Dopaminergic and ligand independent activation of steroid hormone receptors. *Science* 254; 1636-1639, 1991.

Prakash P, Russell R, Krinsky N. In vitro inhibition of proliferation of estrogen-dependent and estrogen-independent human breast cancer cells treated with carotenoids or retinoids. *J Nutr* 131; 1574-1580, 2001.

Pratt W, Toft D. Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocrine Rev* 18: 306-60. 1997.

Razandi M, Pedram A, Greene G, Levin E. Cell membrane and nuclear estrogen receptors (ER's) originate from a single transcript: studies of ER α and ER β expressed in Chinese hamster ovary cells. *Mol Endocrinol* 13: 307-319, 1999.

Receptor binding Techniques. 1980 Short Course Syllabus. Society for neuroscience, Ohio, USA, 1980.

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

Rochefort H, Augereau P, Briozzo P, Capony F, Cavailles V, Freiss G, Garcia M, Maudelonde T, Moruisset M, Touitou I, Vignon F. Estrogen-induced pro-cathepsin D in breast cancer, from Biology to clinical applications.. *Proc R Soc Edinb Sect B (Biol Sci)* 95:107-18, 1989.

Sambrook, Fritsch, Maniatis. Molecular cloning. Cold Spring Harbour Lab, 2nd Ed. USA. 1989.

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.

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;132-140, 1992.

Schuchard M, Landers J, Punkay N, Spelsberg T. Steroid hormone regulation of nuclear protooncogenes. *Endocrine Rev.* 14: 659-669. 1993.

Smith C, Connely O, O'Malley B. Modulation of the ligand-independent activation of the human estrogen receptor by hormone and antihormone. *Proc Natl Acad Sci USA.* 90:6120-6124. 1993.

Strauss J, Gurbide E. The endometrium: regulation and dysfunction. In: *Reproductive endocrinology.* Yen S, Jaffe R. (Eds.) Wb Saunders Co. USA, 1991.

Takimoto G, Graham J, Jackson T, Tung L, Powell R, Horwitz L, Horwitz K. Tamoxifen resistant breast cancer: coregulators determine the direction of

transcription by antagonist-occupied steroid receptors. *J Steroid Biochem Mol Biol* 69 ; 45-50, 1999.

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

Tsay M, O'Malley B. Molecular mechanism of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Ann Rev Biochem* 63: 452-486, 1994.

Unger M, Weber B. Recent advances in breast cancer Biology. *Curr Op Oncology* 12: 521-525, 2000.

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: 250-53. 1993.

Van de Vijver M, Nusse R. The molecular biology of breast cancer. *Biochem Biophys Acta* 1072 :33-50. 1991

Vielh P, Chevillard S, Mosseri V, Donatini B, Magdelenat H. Ki67 index and S-phase fraction in human breast carcinomas. *Am J Clin Pathol* 94; 681-686, 1990.

Visscher D, Wikes S, Kubus J, Crissman J. Comparison of PCNA/cyclin immunohistochemistry with flow cytometry S-phase fraction in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 22; 111-118, 1992.

Visscher D, Zarbo R, Jacobsen G, Kambouris A, Talpos G, Sakr Q Crissman J. Multiparametric DNA and cell cycle analysis of breast carcinomas by flow cytometry. *Lab Invest* 62; 370-378, 1990.

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.

Washburn T, Hocutt A, Brautigan D, Korach K. Uterine estrogen receptor in vivo: phosphorylation of nuclear specific forms on serine residues. *Mol Endocrinol* 5; 235-242, 1991.

Watts C, King R. Overexpression of estrogen receptor in HTB 96 human osteosarcoma cells results in estrogen-induced growth inhibition and receptor cross-talk. *J Bone Min Res* 9: 1251-1258, 1994.

Watts C, Parker M, King R. Stable transfection of the estrogen receptor gene in a human osteosarcoma cell line. *J Steroid Biochem* 34: 483-490, 1989.

- 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.
- Wei P, Ahn I, Housley R, Alam J, Vedeckis V.** Modulation of hormone-dependent glucocorticoid receptor function using a tetracycline-regulated expression system. *J Steroid Biochem Mol Biol* 64; 1-12, 1998.
- Wettergreen A, Hunniford W, Crawford M, Adami R.** An adenoviral system for tetracycline-regulated TGF- β expression mediates a reversible cell cycle arrest. *Eur J Oral Sci* 109; 415-421, 2001.
- Yen S, Ehara Y, Siler T.** Augmentation of prolactin secretion by estrogen in hypogonadal women. *J Clin Invest.* 53: 652-661, 1974.
- Ylikomi T, Bocquel M, Berry M, Gronenmeyer H, Chambon P.** Cooperation of proto-oncogene signals for nuclear accumulation of estrogen and progesterone receptors. *EMBO J* 11; 1-14, 1992.
- 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; 5004-5011. 1993.
- Zajchowsky D, Sager R.** Induction of estrogen regulated genes differs in immortal and tumorigenic human mammary epithelial cells expressing a recombinant estrogen receptor. *Mol endocrinol* 5; 1613-1623, 1991.

Anexo I

Sistema de regulación de la expresión genética de Gossen y Bujard.

Este es un sistema desarrollado por Gossen y Bujard (1992, 1995), en el centro de Biología Molecular de Heidelberg, Alemania, 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, o sus derivados, adicionada al medio de cultivo, el sistema es dosis dependiente del antibiótico.

Consta de dos plásmidos; el primero codifica para un transactivador proteico de 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 el represor de tetraciclina (**tetRep**) y las secuencias reguladoras de 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 tetRep. El producto proteico de este elemento regulador está unido, en ausencia de tet, a una secuencia consenso en la región promotora del operón, 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 operón. (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**, está controlado por el promotor de citomegalovirus humano IE (**PhCMV**) (Fig. 6), y codifica para una proteína de 37 KDa de peso molecular y 337 aa. que se conoce como transactivador de tetraciclina (**tetTa**).

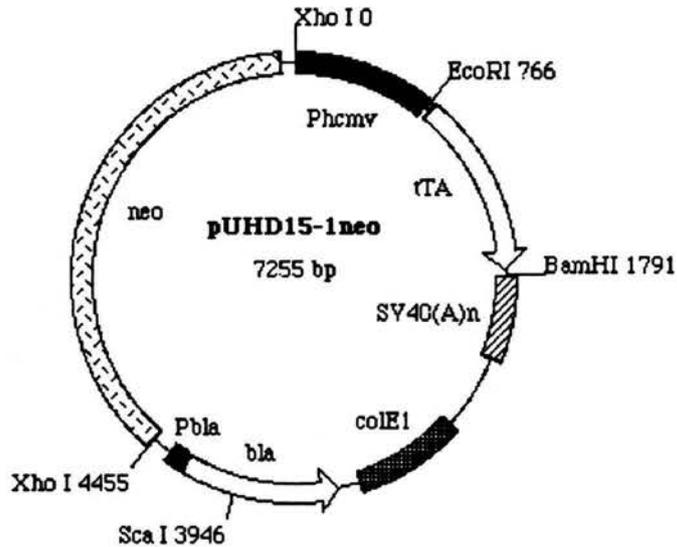


Figura 1. Construcción del pUHD 15-1neo o pTet-Off.

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 gen de interés, posteriormente se le agregó el extremo de poliA de SV 40. El plásmido se denomina **pUHD 10-3** o **pTRE** (plásmido del elemento de respuesta a tetraciclina) (Fig. 2)

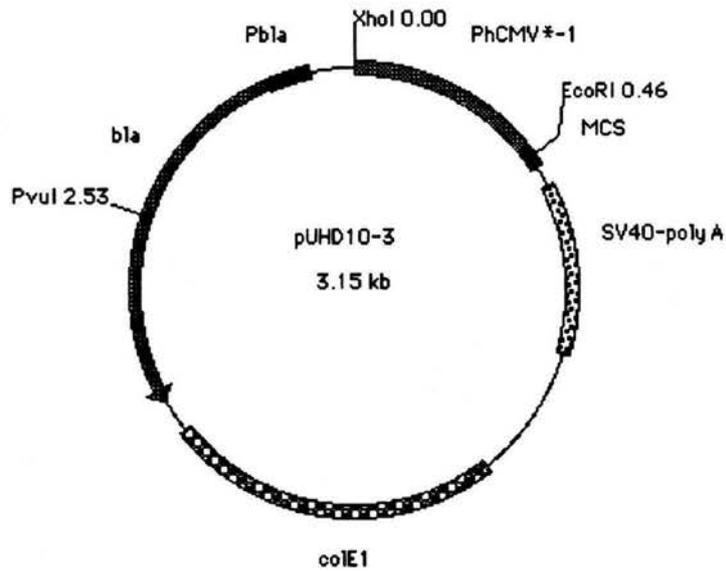


Figura 2. Construcción del pUHD 10-3 o pTRE, el gen HEGO fue clonado en el sitio Eco R1 del MCS.

El tetTA se une, en ausencia de tet o doxiciclina (DOX), a esta construcción en la secuencia de 19 pb 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 se une al antibiótico, y por lo tanto no se puede unir al tetOp y la transcripción no se inicia.