



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA**

**EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS DEL
INDOL-3-CARBINOL Y SU DÍMERO EL DI-INDOL
METANO SOBRE LA EXPRESIÓN DE LA
2-HIDROXILASA Y LA 16 α -HIDROXILASA EN CÉLULAS
DE CÁNCER DE MAMA**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
B I Ó L O G O

P R E S E N T A:
EFRÉN MÉNDEZ GÓMEZ

DIRECTORA DE TESIS:

Dra. ANA ELENA LEMUS BRAVO

MÉXICO, D.F. Octubre de 2009





Universidad Nacional
Autónoma de México



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

**Facultad de Estudios Superiores
Zaragoza**

Licenciatura de Biología

Tesis que presenta: Efrén Méndez Gómez

El presente trabajo fue realizado en el laboratorio de Bioquímica Hormonal, del Departamento de Biología de la Reproducción “Dr. Carlos Gual Castro” del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”, bajo la dirección de la Dra. Ana Elena Lemus Bravo y como asesora interna la Dra. María Elena Ayala Escobar FES-Zaragoza. Para la realización de esta tesis se contó con apoyo de: la División de C.B.S., Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, el Departamento de Biología de la Reproducción “Dr. Carlos Gual Castro”, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán” y el Macroproyecto SDI.PTID-05-3, UNAM.

Agradecimientos:

A la Dra. Ana Elena Lemus Bravo Profesora Titular "C", Departamento de Biología de la Reproducción, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa por su dirección y ayuda en la realización de la tesis.

Al Dr. Gregorio Pérez Palacios, Director General del Instituto Nacional de Perinatología "Isidro Espinosa De los Reyes" por el apoyo brindado para realizar esta tesis.

A la Dra. María Elena Ayala Escobar Profesora Titular "B" Departamento de Biología de la Reproducción Universidad Nacional Autónoma de México - FES Zaragoza por su valiosa asesoría.

A los miembros del jurado:

M. C. Raúl Zavala Chavero

M. en B. Enrique Mendieta Márquez

Dra. Leticia Morales Ledesma

Por su valiosa contribución y asesoría en la elaboración de esta tesis.

Al Biólogo Experimental Rene Santillán Ballesteros, Laboratorio de Bioquímica Hormonal, Departamento de Biología de la Reproducción "Dr. Carlos Gual Castro" del Instituto Nacional de Ciencias Medicas y Nutrición "Salvador Zubiran" (INCMNSZ) por su asesoría y apoyo en la realización de la tesis.

Al Dr. Fernando Larrea Gallo, Jefe del Departamento de Biología de la Reproducción “Dr. Carlos Gual Castro”, INCMNSZ, por el apoyo brindado para realizar esta tesis.

Al Dr. Armando Tovar Palacios Jefe del Departamento de Fisiología de la Nutrición, División de Nutrición INCMNSZ, por las facilidades otorgadas para realizar el PCR en tiempo real.

A la M. en B. Berenice Palacios González, Departamento de Fisiología de la Nutrición, División de Nutrición, INCMNSZ, por su valiosa asesoría en el análisis de los resultados de la tesis.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por haberme otorgado la beca 4572 como ayudante de investigador del Dr. Gregorio Pérez Palacios Investigador Nacional Emerito.

A todos los miembros del Laboratorio de Bioquímica Hormonal del Departamento de Biología de la Reproducción “Dr. Carlos Gual Castro”, INCMNSZ.

DEDICATORIA

A MI FAMILIA

A MIS AMIGOS

POR DEMOSTRARME SU APOYO INCONDICIONAL

INDICE

<i>Introducción</i>	1
<i>Cáncer de mama en México</i>	11
<i>Antecedentes</i>	14
<i>Citocromo P-450</i>	14
<i>Gen CYP1A1</i>	15
<i>Gen CYP3A7</i>	16
<i>Justificación</i>	18
<i>Hipótesis</i>	19
<i>Objetivo General</i>	20
<i>Objetivos Particulares</i>	20
<i>Materiales y Métodos</i>	22
<i>Cultivo Celular</i>	23
<i>Extracción de RNA Total</i>	24
<i>Síntesis de cDNA</i>	26
<i>PCR Tiempo Real</i>	27
<i>Análisis Estadístico</i>	28
<i>Resultados</i>	29
<i>CYP1A1</i>	29
<i>CYP3A7</i>	35

<i>Discusión</i>	40
<i>Conclusiones</i>	50
<i>Referencias Bibliográficas</i>	51



RESUMEN

El indol-3-carbinol (I3C) se encuentra en los vegetales crucíferos del género *Brassica* como la col, coliflor, brócoli, col de bruselas y berza. El consumo de estos vegetales se ha relacionado con una disminución en el riesgo relativo a desarrollar cáncer de mama. El Indol-3-carbinol y su dimero el Di-indol metano (DIM) han sido reportados como compuestos con capacidad para modificar el metabolismo del E_2 y de la E_1 . Se ha relacionado que un aumento en la formación del metabolito 16α -hidroxilado de la E_1 puede incrementar el riesgo relativo a desarrollar cáncer de mama. Por otra parte el metabolito 2-hidroxilado de la E_1 ha sido relacionado con una disminución del riesgo relativo a desarrollar carcinoma mamario. En esta tesis se evaluaron los efectos del I3C y DIM, a la concentración de $10\ \mu\text{M}$, incubados 24, 48 y 72 horas con células de cáncer de mama MDA-MB 231, sobre la expresión relativa del RNAm de los genes CYP1A1 y CYP3A7, que codifican a las enzimas 2-hidroxilasa y a la 16α -hidroxilasa, respectivamente; estas enzimas introducen hidroxilos en las posiciones 2 y 16 en las moléculas de E_1 y E_2 . La expresión relativa del RNAm del CYP1A1 se modificó con respecto a las células control desde las 24 horas y hasta las 72 horas de incubación. La expresión relativa del RNAm del gen CYP3A7 se modificó solo en los dos primeros tiempos. Los datos obtenidos mostraron que el I3C y el DIM tienen la capacidad de modificar la expresión relativa del RNAm de los genes CYP1A1 y CYP3A7. De manera interesante se pudo observar que el DIM tiene una mayor potencia biológica para modificar la expresión relativa del gen CYP1A1 en comparación con el I3C.

INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama representa en la actualidad, un desafío en materia de salud pública, a nivel mundial. El incremento tan notable en la prevalencia de cáncer de mama, observado en las últimas décadas, refleja el impacto de factores de riesgo relacionados, algunos de ellos, con estilos contemporáneos de vida.

El cáncer de mama es una neoplasia maligna que reconoce un origen multifactorial (Hulka y Stark, 1995) y algunos de los factores que podrían contribuir al incremento del riesgo del cáncer de mama en la mujer se enlistan a continuación:

- Menarquia temprana (inicio de la menstruación antes de los 12 años de edad)
 - Menopausia tardía (posterior a los 50 años)
 - Nuliparidad (no haber tenido hijos)
 - Primer embarazo tardío (posterior a los 30 años)
 - Ausencia de lactancia al seno materno
 - Obesidad pre y posmenopáusica
 - Terapia hormonal por tiempo prolongado
 - Antecedentes familiares directos (abuela, madre y hermanas con cáncer mamario)
-
-

Por otra parte, se han reconocido mutaciones en genes de susceptibilidad al cáncer mamario, como el BRCA-1 y BRCA-2, localizados en los cromosomas 17 y 13, respectivamente (Miki *et al.*, 1994; Wooster *et al.*, 1995; Feigelson *et al.*, 1996), aunque debe señalarse que estas alteraciones génicas ocurren en un porcentaje bajo de pacientes (~5%) y se presentan en agregados familiares (Dotzlaw *et al.*, 1992; Fugua *et al.*, 1993; Miksicek *et al.*, 1993).

La prevalencia de cáncer de mama varía considerablemente entre las diferentes poblaciones del mundo, lo cual introduce otro factor de riesgo que es la etnicidad. En el Reporte Mundial de Cáncer de la Organización Mundial de la Salud (OMS) de 1997 se señala que la ocurrencia de cáncer mamario en la población asiática es significativamente menor en comparación con la población caucásica y que el riesgo a esta neoplasia es mayor en países anglosajones (Adlercreutz, 1990; Coker *et al.*, 1997; Porter, 2008). Estas diferencias étnicas se asocian además, con estilos de vida y hábitos alimentarios de las poblaciones asiáticas, particularmente los relacionados con el consumo de verduras, principalmente de crucíferas del género *Brassica*, como la col, coliflor, brócoli, col de bruselas y berza, que de acuerdo a un número importante de estudios, disminuyen el riesgo a desarrollar cáncer de mama (Bradlow *et al.*, 1996; Fowke *et al.*, 2000)

Los resultados de un número importante de estudios clínicos controlados (Lord *et al.*, 2002), en los que se evaluó la relación entre la ingestión de verduras y frutas frescas y una disminución del desarrollo de cáncer mamario, permitieron a la World Cancer Research Foundation y al American Institute for Cancer Research considerar que existe suficiente evidencia que el consumo de verduras, particularmente de crucíferas, reduce el riesgo a padecer cáncer de mama y a recomendar una ingesta mínima de brócoli de 100 gramos dos veces por semana (Bradlow *et al.*, 1996).

El mecanismo por el cual las verduras crucíferas ejercen su efecto protector, no ha sido totalmente esclarecido; sin embargo, se ha relacionado la disminución del riesgo de cáncer mamario con su alto contenido de indoles, particularmente del Indol-3-Carbinol (I3C). Los indoles provienen de la hidrólisis de los glucosinolatos que contienen las verduras crucíferas, estos al ser hidrolizados por la enzima mirosinasa dan origen a la formación de compuestos biológicamente activos como el I3C, que al entrar en contacto con el ambiente ácido estomacal es transformado principalmente en di-indolmetano [DIM] (Higdon *et al.*, 2007) [Figura 1].

Estudios en diversas especies animales (rata y raton) han demostrado que la molécula del I3C y su principal metabolito el DIM, tienen efectos antiestrogénicos, citostáticos y antitumorogénicos en la glándula mamaria (Telang *et al.*, 1997; Cover *et al.*, 1998; Jin *et al.*, 1999; Yoshida *et al.*, 2004).

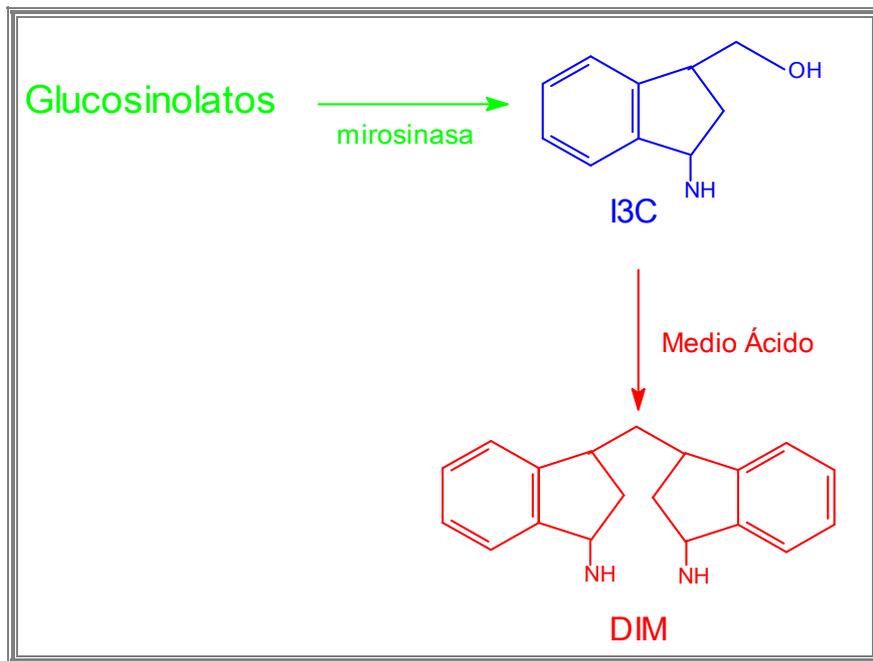


Figura 1. Hidrólisis de los glucosinolatos por la enzima mirosinasa y estructura química del Indol-3-Carbinol (I3C) y su Dimero el Di-Indol metano (DIM).

Otros factores importantes en el incremento de riesgo de cáncer de mama, son los de origen hormonal, los cuales están asociados a la exposición prolongada, endógena y exógena, de hormonas esteroides sexuales, particularmente de estrógenos (Yue *et al.*, 1998). Los estrógenos son las hormonas esteroides responsables del crecimiento y desarrollo de las características sexuales secundarias femeninas. Actúan sobre el crecimiento óseo y sobre el metabolismo y disposición de los depósitos grasos (muslos, mamas y caderas) en la mujer.

Los estrógenos más importantes son la estrona (E_1), el estradiol (E_2) y el estriol (E_3) los cuales se producen principalmente en los folículos en crecimiento durante la fase folicular o proliferativa del ciclo menstrual (Di Zerga y Hodgen, 1981) y en el cuerpo lúteo después de la ovulación (Goodman y Hodgen, 1983), así como en la placenta (Gibori *et al.*, 1988).

Los estrógenos se biosintetizan a partir de los andrógenos como la testosterona y la androstendiona, siendo el citocromo P450 CYP19 o aromatasa, la enzima que interviene en esta bioconversión. Esta enzima se encuentra en las células de la granulosa del ovario, el tejido adiposo, los fibroblastos de la piel, la placenta, la glándula mamaria, el folículo piloso y el cerebro, y su actividad puede ser modulada por la dieta (Mahendroo *et al.*, 1991; Means *et al.*, 1991; Harada 1992; Bulun *et al.*, 1993; Simpson *et al.*, 1996).

Algunos tumores (benignos o malignos) estrógeno-dependientes, comparten la característica de presentar una mayor expresión de la aromatasa, como es el caso de los miomas, la endometriosis y particularmente el cáncer de mama, por lo que el uso de inhibidores de esta enzima ha representado una buena estrategia en el tratamiento de estos padecimientos (Brodie, 2002; Brueggemeier *et al.*, 2005).

Los estrógenos se metabolizan tanto en los órganos blancos como periféricos. Las vías metabólicas de E₁ y E₂, se muestran en la figura 2. El E₂ se biotransforma a E₁, y ambos, a sus metabolitos hidroxilados en diferentes posiciones de la molécula. La oxidación de los estrógenos para la formación de compuestos hidroxilados es la principal vía metabólica. El hidroxilo puede ser introducido en los carbonos 2 ó 16, siendo los genes CYP1A1 y CYP3A7 los que codifican respectivamente a la 2-hidroxilasa y 16 α -hidroxilasa, responsables de la hidroxilación en las dos diferentes posiciones de la molécula. Los productos de la biosíntesis son: 2-hidroxi-E₂ (2-OHE₂), 2-hidroxi-E₁ (2-OHE₁), 16 α -hidroxi-E₂ (16 α -OHE₂) y 16 α -hidroxi-E₁ (16 α -OHE₁). La vía preferente hacia la que se orienta el metabolismo de los estrógenos depende de la expresión predominante de uno de los dos genes CYP1A1 o CYP3A7. Posteriormente, los derivados 2-hidroxilados son metilados por acción de la enzima catecol-*o*-metil-transferasa (COMT). Los productos resultantes se conjugan para formar glucuronatos o sulfatos (Lord *et al.*, 2002), los cuales se eliminan en la bilis, a través de la materia fecal, y en la orina (Fishman *et al.*, 1990).

En la actualidad, el estudio del metabolismo de los estrógenos ha adquirido gran relevancia por la asociación de los productos de su bioconversión con el cáncer de mama. Es importante destacar que los metabolitos 2-hidroxilados tiene actividades biológicas opuestas a los 16 α -hidroxiderivados.

La hidroxilación del carbono 2 hace que se pierda gran parte de la potencia estrogénica y con ello su acción proliferativa (Bradlow *et al.*, 1996), mientras que los 16α -hidroxilados estimulan la mitosis y por lo tanto, la proliferación celular (Telang *et al.*, 1992; Suto *et al.*, 1993).

Diversas evidencias han sugerido que las alteraciones en el metabolismo del E_2 están ligadas al riesgo de cáncer de mama. Se ha observado que en aquellas mujeres que presentan una alta tasa de formación de 2-hidroxi- E_1 , el riesgo de presentar cáncer de mama disminuye en un 40%. En cambio, los resultados de diversas investigaciones sugieren fuertemente que las mujeres que metabolizan los estrógenos preferentemente hacia la 16α -hidroxi- E_1 , presentan efectos genotóxicos (Telang *et al.*, 1992; Davis *et al.*, 1997; Kabat *et al.*, 1997).

En algunos modelos experimentales (animales y líneas celulares), se ha observado que la 16α -OHE₁ tiene propiedades tumorigénicas y genotóxicas, mientras que la 2-OHE₁ tiene poca actividad estrogénica (Lippert *et al.*, 2000). Se ha sugerido que el incremento de la vía de la 16α -hidroxilación y la disminución en la formación de los metabolitos 2-hidroxilados, son factores de riesgo a cáncer de mama (Swanek y Fishman, 1988, Falk *et al.*, 2000).

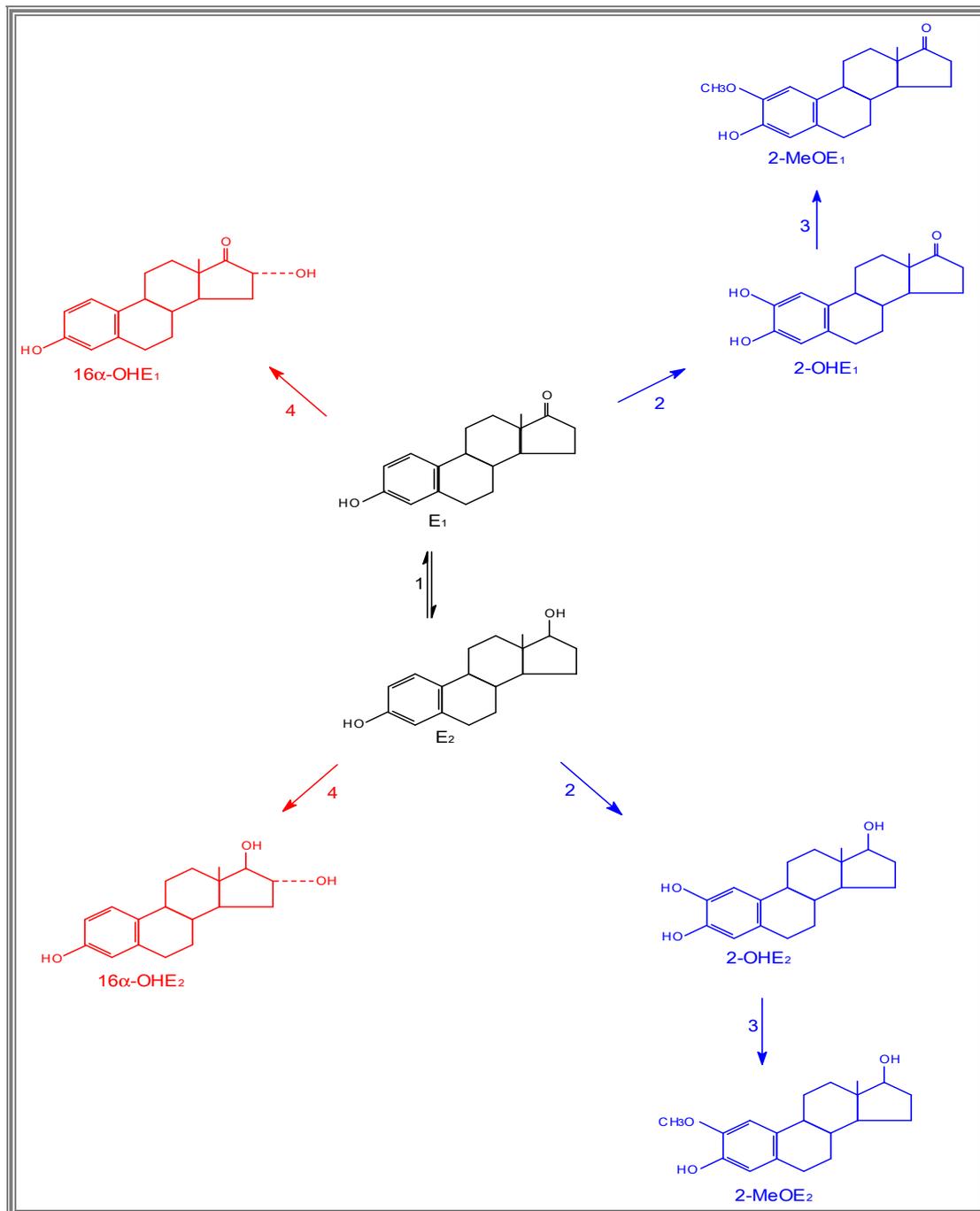


Figura 2. Vías metabólicas de estradiol (E₂) y estrona (E₁). Las enzimas que participan en el metabolismo de los estrógenos son: 1) 17β-Hidroxiesteroide deshidrogenasa; 2) 2-hidroxilasa; 3) Catecol-*o*-Metiltransferasa y 4) 16α-hidroxilasa. Los productos resultantes son: 2-hidroxi-E₁ (2-OHE₁), 2-metoxi-E₁ (2-MeO-E₁), 16α-hidroxi-E₁ (16α-OH-E₁), 2-hidroxi-E₂ (2-OHE₂), 2-metoxi-E₂ (2-MeO-E₂) y 16α-hidroxi-E₂ (16α-OH-E₂).

Un estudio, de más de 9 años de seguimiento, en mujeres mayores de 35 años, demostró una asociación entre la disminución de la relación $2\text{-OHE}_1/16\alpha\text{-OHE}_1$ y la aparición de cáncer de mama (Meilahn *et al.*, 1998), mientras que otro estudio de seguimiento por más de cinco años, de mujeres entre 35 y 64 años de edad, mostró que un elevado índice de la relación de los metabolitos urinarios 2-OHE_1 y $16\alpha\text{OHE}_1$, estaba relacionado con un bajo riesgo de cáncer de mama (Muti *et al.*, 2000). Con base en estas observaciones, se ha propuesto que la determinación de la relación de derivados 2-hidroxilados/ 16α -hidroxilados, en muestras de orina, podría ser un biomarcador de utilidad, que permita detectar oportunamente, el riesgo a desarrollar cáncer de mama (Meilahn *et al.*, 1998; Muti *et al.*, 2000; Yoo *et al.*, 2001).

Estudios bioquímicos de la $16\alpha\text{-OHE}_1$, han demostrado que este derivado de la E_1 se une con baja afinidad al receptor de estrógenos (Martucci y Fishman, 1977); sin embargo su actividad biológica de tipo estrogénica es muy potente (Fishman y Martucci, 1980) debido a que es capaz de unirse al receptor de estrógenos en forma covalente e irreversible (Swanek y Fishman, 1988).

Esta unión se realiza mediante la formación una base de Schiff con los grupos amino primarios de los residuos de lisina del receptor y un posterior rearreglo de Heyns que resulta en la unión covalente entre el esteroide 16α -hidroxilado y el receptor de estrógenos (Figura 3). Esta demostración correlaciona perfectamente

bien con las observaciones de que la formación en exceso de 16α -OHE₁, incrementa el riesgo de cáncer de mama (Swanek y Fishman, 1988; Falk *et al.*, 2000). Por otra parte, se ha demostrado que los índoles de las verduras crucíferas tienen la capacidad de modificar el metabolismo del E₂, orientándolo a una mayor formación de derivados 2-hidroxilados (Bradlow *et al.*, 1996; Horn *et al.*, 2002; Androutsopoulos *et al.*, 2009) con la consecuente disminución de la formación de los compuestos 16α -hidroxilados (Michnovicz y Bradlow, 1990; Fowke *et al.*, 2000; Higdon *et al.*, 2007), lo cual explicaría los efectos benéficos del hábito de consumir verduras crucíferas, para la disminución del riesgo de cáncer de mama. Por otra parte, se ha demostrado que el I3C actúa como antiproliferativo en cultivos de líneas celulares (Michnovicz y Bradlow 1990; Niwa *et al.*, 1994; Cover *et al.*, 1998; Meng *et al.*, 2000).

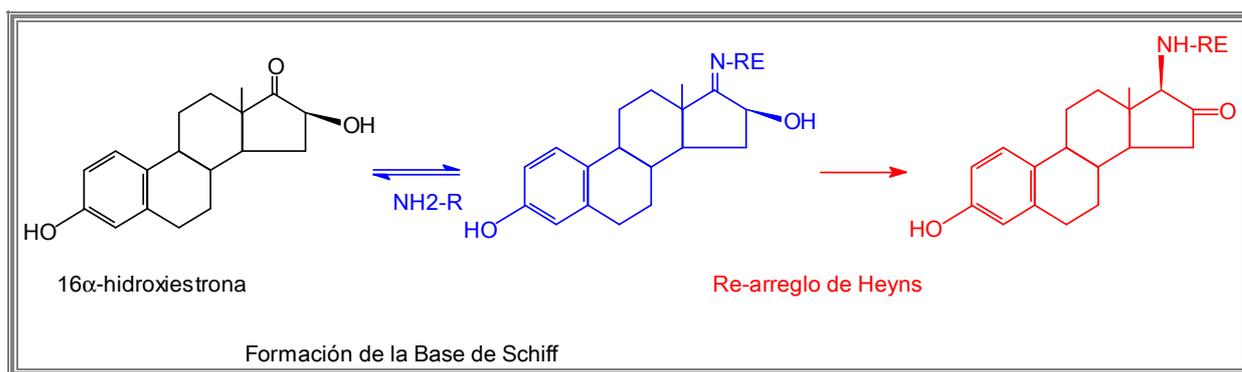


Figura 3. Formación de la base de Schiff y el re-arreglo de Heyns.

Cáncer de Mama en México

En México, en el año 2007, los decesos en la población causados por tumores malignos ocuparon el tercer lugar como causa de muerte. En ese mismo año se reportaron 4,931 defunciones de mujeres por cáncer de mama, lo que corresponde a una tasa de mortalidad de 9.2 por 100,000 mujeres y constituye la primera causa de muerte por neoplasias malignas en mujeres de 25 años y más, colocándose por encima de padecimientos como el cáncer cérvico uterino, cáncer de hígado y vías biliares, tráquea, bronquios y pulmón (INEGI, 2009). La mayor incidencia de cáncer mamario se presenta en la mujer mexicana a partir de los 40 años de edad.

El incremento tan notable en la ocurrencia de cáncer de mama en nuestro país, particularmente en las regiones norte y occidente, así como en el Distrito Federal, está relacionado con las transiciones demográfica y epidemiológica que vive nuestro país, así como con los patrones alimentarios y estilos de vida contemporáneos importados de otros países (Pérez Palacios, 1996).

Por el origen multifactorial del cáncer de mama, ha sido difícil el desarrollo de métodos de prevención y detección oportuna de esta neoplasia maligna. La autoexploración de las glándulas mamarias, y la exploración clínica realizada por el médico, no son lo suficientemente efectivas para la detección oportuna

de cáncer mamario, por lo que actualmente el método de diagnóstico disponible y más confiable es la mastografía. Lamentablemente, en México, no se cuentan con los suficientes equipos para la realización de este procedimiento ni con el número suficiente de profesionales que puedan llevar a cabo esta técnica. Es por lo tanto impostergable el desarrollo de estrategias que valoren el riesgo y permitan la prevención del desarrollo de esta neoplasia maligna.

Los grupos de investigación de los Departamentos de Biología de la Reproducción del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”, y de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, así como investigadores del Instituto Nacional de Perinatología “Isidro Espinosa de los Reyes”, actualmente están estudiando, en muestras de orina de un grupo de mujeres mexicanas voluntarias, con cierto riesgo a padecer cáncer de mama la relación $2\text{-OHE}_1/16\alpha\text{-OHE}_1$, con el objetivo de desarrollar una estrategia que permita disponer de un método no invasivo, que no requiera de tecnología sofisticada y que se pueda simplificar para convertirlo en una prueba sencilla, no agresiva y relativamente de bajo costo, para la valoración de riesgo a cáncer mamario en México.

Estudios del metabolismo *in vitro* de estradiol y estrona isotópicamente marcados, en cultivos de células MDA-MB 231, de cáncer de mama no dependiente de estrógenos, realizados por el mismo grupo interinstitucional de investigadores, han demostrado en la línea celular estudiada, la actividad de las enzimas 2-hidroxilasa y 16 α -hidroxilasa, que catalizan respectivamente, la reacción de 2 y 16 α -hidroxilación de los estrógenos. En los mismos estudios se demostró, que la presencia de I3C y de DIM, fue capaz de inducir cambios significativos en el metabolismo de los estrógenos. Estos resultados han motivado al grupo de investigadores a estudiar el efecto de esos indoles sobre la expresión génica de las enzimas 2-hidroxilasa y 16 α -hidroxilasa, en diferentes líneas celulares de cáncer de mama. Los resultados permitirán tener un mayor conocimiento del mecanismo de acción del I3C y de su dímero, y las ventajas que pudiera representar su uso como agentes protectores de cáncer de mama, en beneficio de la mujer mexicana.

ANTECEDENTES

Citocromo P450

El citocromo P450 (CYP P450) está constituido, por una super familia de enzimas involucradas en la biosíntesis de diversos compuestos (endógenos y exógenos). El CYP P450 acelera la eliminación del organismo de gran número de fármacos y compuestos tóxicos y su expresión puede estar regulada por factores genéticos, fisiopatológicos o ambientales (Guengerich, 1999).

Además de su actividad en los procesos de biosíntesis, el CYP P450 participa en el metabolismo de xenobióticos, compuestos químicos que no forman parte de la composición habitual del organismo, pero son capaces de acceder a su interior e inducir efectos nocivos. Una de las características de los CYP P450 que metabolizan xenobióticos es su baja especificidad, lo que permite que sean capaces de actuar sobre un gran número de substratos, principalmente a través de reacciones de oxidación. Las oxidaciones catalizadas por el CYP P450 son reacciones de mono-oxigenación (Finta y Zaphiropoulos, 2000).

Los genes que codifican a las enzimas del CYP P450 se identifican con las siglas CYP (Cytochrome P) seguidas de un número que designa la familia, una letra que identifica la subfamilia y otro número que corresponde con el polipéptido, por ejemplo CYP1A1. Una familia agrupa aquellos CYPs cuya

secuencia de aminoácidos tienen una similitud mayor del 40%. Dentro de cada familia, los CYPs se agrupan en diferentes subfamilias las cuales, se denominan alfabéticamente, CYP1A o CYP1B. Dos CYPs pertenecerán a la misma subfamilia cuando su homología en la secuencia de aminoácidos sea superior al 55%. Dentro de la misma subfamilia, los CYPs se designan numéricamente CYP1A1, CYP1A2, etc.; dos CYPs se consideran diferentes cuando sus secuencias difieran en más de un 3% (Nelson, 1999).

GEN CYP 1A1

El CYP1A1 es un gen que codifica a la enzima 2-hidroxilasa. La expresión del CYP1A1 ocurre predominantemente en tejidos extrahepáticos como la glándula mamaria, el pulmón, la placenta y los linfocitos, además de presentar formas polimórficas (Masson *et al.*, 2005).

El CYP1A1 se ha relacionado con el metabolismo del E₂ y la E₁, ya que algunos estudios realizados han demostrado que la enzima a la que codifica es capaz de hidroxilar a estos esteroides en el carbono número 2 [Figura 4] (Lee *et al.*, 2003a; Kisselev *et al.*, 2005).

Se ha relacionado la capacidad de los indoles para aumentar la expresión del CYP1A1 por la afinidad que presentan por el receptor de los hidrocarburos de arilo (AHR). Diversos estudios realizados en hígado y glándula mamaria de

rata que fueron tratados con I3C, han demostrado un aumento en la expresión del RNAm del CYP1A1 (Nao y Jeffery 2001, Horn *et al.*, 2002), y con un cambio en el metabolismo de E₂ y E₁ (Fowke *et al.*, 2000; Lampe y Peterson, 2002).

GEN CYP3A7

En el humano la subfamilia 3A contiene 4 miembros que son el CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7 y CYP3A43 (Finta y Zaphiropoulos, 2000), que codifican a enzimas que metabolizan a hormonas esteroides, carcinógenos y a más del 50% de medicamentos usados en clínica (Dally *et al.*, 2004).

El CYP3A7 se expresa de forma predominante en hígado fetal, aunque también se ha reportado su expresión en el hígado del adulto y algunos tejidos extrahepáticos; además se le ha relacionado con el metabolismo del E₂ y la E₁. Un estudio realizado en hígado humano, donde se evaluó la actividad de diferentes enzimas para catalizar la hidroxilación de la molécula de la E₁, demostró que el CYP3A7 que codifica a la 16 α -hidroxilasa es capaz de hidroxilar a la E₁ preferentemente en la posición 16 α [Figura 4] (Lee *et al.*, 2003b).

La enzima 16 α -hidroxilasa ha sido propuesta como un importante catalizador para la formación del procarcinógeno 16 α -hidroxiestróna (Lee *et al.*, 2003b). Como ya se ha mencionado, este metabolito de la E₁, se ha relacionado fuertemente con el aumento del riesgo a padecer cáncer de mama (Swanek y Fishman, 1988).

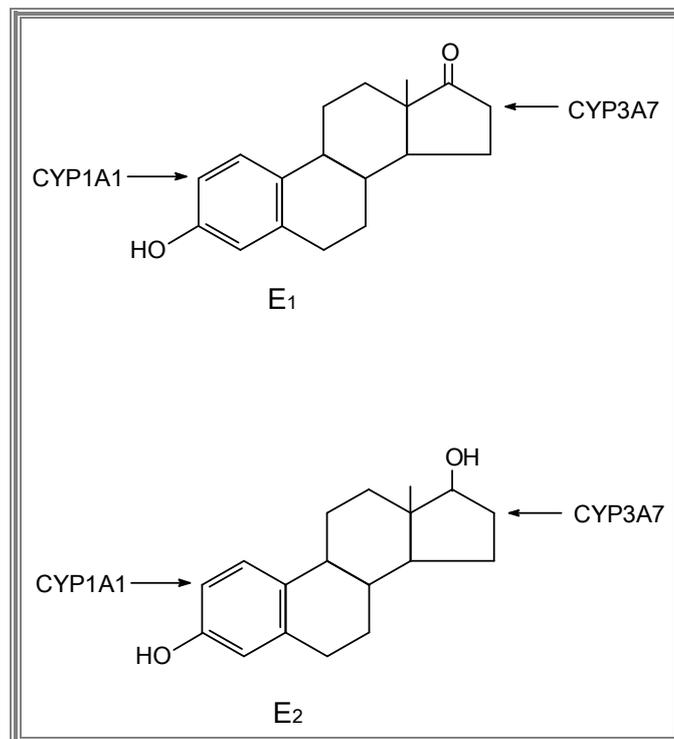


Figura 4. Sitios en las moléculas de E₁ y E₂ susceptibles de ser oxidados por la actividad de enzimas codificadas por los CYPs 1A1 y 3A7.

JUSTIFICACIÓN

En México, el cáncer de mama constituye la primera causa de muerte por neoplasias malignas, en mujeres de 25 años y más. La mayor frecuencia de cáncer mamario se presenta en la mujer mexicana, a partir de los 40 años de edad y, de acuerdo a las estimaciones del Consejo Nacional de Población, el universo de mujeres de 40 años y más, alcanzó en el año de 2006, la cifra de 15 millones, por lo que este padecimiento maligno ya se ha constituido como un problema de salud pública. Un factor reconocido de riesgo a cáncer de mama en la mujer, es la exposición a estrógenos, por periodos prolongados de tiempo, con fines anticonceptivos o de terapia de reemplazo hormonal, ya que existe suficiente evidencia de que en sus inicios, todos los cánceres de mama son dependientes de estrógenos. Aun cuando un número importante de estudios sugieren que compuestos de origen vegetal como el indol-3-carbinol y el di-indol metano modifican el metabolismo de la estrona y el estradiol, orientándolo hacia una mayor formación de derivados 2-hidroxilados que disminuyen en la mujer el riesgo a cáncer de mama, se desconoce el efecto que estos indoles tienen sobre la expresión de los genes CYP1A1 y CYP3A7 que codifican a la 2-hidroxilasa y 16 α -hidroxilasa, enzimas que introducen radicales hidroxilos en los carbonos 2 y 16 α respectivamente en las moléculas de estrona y estradiol.

El conocimiento que se obtenga del estudio de los efectos de los indoles sobre la expresión de los genes CYP1A1 y CYP3A7, podría aportar información importante para desarrollar nuevas estrategias terapéuticas que contribuyan a disminuir uno de los tantos riesgos al desarrollo del cáncer de mama en la mujer.

HIPÓTESIS

El Indol-3-Carbinol y su dimero el Di-indol metano modifican la expresión de los genes CYP1A1 y CYP3A7, que codifican a las enzimas 2-hidroxisasa y 16 α -hidroxisasa respectivamente, en la línea celular de cáncer de mama, MDA-MB 231.



OBJETIVO GENERAL

Demostrar la capacidad del Indol-3-Carbinol y su dimero, el Di-indol metano para modificar la expresión de los genes CYP1A1 y CYP3A7, en la línea celular MDA-MB 231 de cáncer de mama.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Seleccionar las sondas específicas para los genes CYP1A1 y CYP3A7 del humano.
 2. Evaluar en la línea celular MDA-MB 231 el efecto del Indol-3-Carbinol y del Di-indol metano, en diversas condiciones experimentales, sobre la expresión del RNA mensajero (RNA_m) de los genes CYP1A1 y CYP3A7, mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real, empleando las sondas específicas seleccionadas.
-
-

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Selección de las Sondas

Para realizar la selección de las sondas específicas para los genes CYP1A1 y CYP3A7 del humano, se empleó la base de datos de Applied Biosystem (Santa Cruz, Cal., EUA). Utilizando esta base de datos, con los nombres de los genes, se realizó la búsqueda de la especie, identificación del cromosoma en el que se localizan, citocromo al que pertenece así como la familia, subfamilia y polipéptido, a los que corresponden los genes. Con toda esta información, la base de datos de Applied Biosystem proporciona el código de identificación de cada una de las sondas. Las sondas se encuentran marcadas con un fluoróforo (FAM) en su extremo 5'.

NOMBRE DEL GEN	ESPECIE	CROMOSOMA	CITOCROMO	FAMILIA	SUB FAMILIA	POLIPÉPTIDO
<i>CYP1A1</i>	<i>Homo sapiens</i>	<i>15</i>	<i>P-450</i>	<i>1</i>	<i>A</i>	<i>1</i>
<i>CYP3A7</i>	<i>Homo sapiens</i>	<i>7</i>	<i>P-450</i>	<i>3</i>	<i>A</i>	<i>7</i>

Códigos de identificación de los genes:

CYP1A1 Hs00426361_m1

CYP3A7 Hs00153120_m1

2. Cultivo Celular

2.1 La línea celular MDA-MB 231 fue amablemente proporcionada por el Dr. Alejandro Zentella, Jefe del Departamento de Bioquímica del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubiran". El cultivo de la línea celular MDA-MB 231 se llevó al cabo en un incubador Steri-Cult de Termo Electron Corporation (Marieta, Ohio, EUA), en una atmósfera de 5% de CO₂, 95% de aire, 85% de humedad y 37° C, empleando el medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) libre de rojo fenol, suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10% e inactivado con calor (Invitrogen, Londres, Reino Unido), aminoácidos no esenciales (100X), Piruvato de sodio (100 mM), L-Glutamina (200 mM), 10,000 unidades de penicilina/ml y anfotericina 25 mg/ml. Las células se incubaron en botellas de 75 cm² hasta su confluencia.

2.2 Se realizó el conteo celular en un hemocitómetro (cámara de Neubauer) y se sembraron 6x10⁶ células/caja de Petri, empleando el medio DMEM libre de rojo fenol, suplementado al 10% con SFB previamente pre-tratado con carbón/dextran (10:1), para eliminar las hormonas esteroides presentes en el suero.

Las células se trataron con el Indol-3-carbinol y Di-indol metano a la concentración de 10 μ M, y se incubaron por 24, 48 y 72 hrs. a las mismas condiciones descritas en el cultivo celular. La concentración de 10 μ M fue seleccionada con base en estudios previos realizados por nuestro grupo de trabajo, en los que se determinó que con esta concentración de indoles, se obtiene el mayor efecto sobre el metabolismo de E₂ y E₁.

2.3 La viabilidad celular fue evaluada por el método de exclusión de captación con azul tripan, como se describe a continuación: De la suspensión celular que se utilizó para realizar la extracción del Ácido Ribonucleico (RNA) total, se tomo una alícuota de 10 μ l que contiene 12,000 células, se mezcló con 10 μ l de una solución acuosa de azul tripan al 0.1% y se observó al microscopio, haciendo uso de un hemocitometro. Se determinó el número de células que se tiñeron con el azul tripan que son aquellas en las que se presenta disrupción membranal (células muertas).

3. Extracción del Ácido Ribonucleico Total

Al finalizar los diferentes tratamientos, se llevó al cabo la extracción del RNA total de las células, utilizando Trizol[®] siguiendo el protocolo de Invitrogen como se describe a continuación:

Las células se desprendieron de la caja de Petri agregando 3 ml de tripsina con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 4 mM al 25%, se centrifugaron a 2000 revoluciones por minuto (RPM) por 5 minutos, se decantó el sobrenadante y al botón celular obtenido se le agregaron 5 ml de solución buffer de fosfatos (PBS), se resuspendieron las células y se centrifugaron nuevamente a 2000 RPM por 5 minutos a temperatura ambiente. Se decantó el sobrenadante y se agregó 1 ml de Trizol[®], dejándolo actuar a temperatura ambiente por 10 minutos. Posteriormente, se agregaron 200 μ l de cloroformo, se agitó en vortex por 1 minuto, y se centrifugó a 14,000 RPM durante 15 minutos, a 4^o C. Se transfirió la fase acuosa a un tubo de 1.5 ml, se adicionaron 500 μ l de isopropanol y se centrifugó a 12,000 RPM durante 10 minutos, a 4^o C. Se eliminó el isopropanol por decantación y se agregó 1 ml de etanol acuoso al 75%, se centrifugó a 7,500 RPM durante 5 minutos a 4^o C y se decantó el sobrenadante. El precipitado se resuspendió en 20 μ l de agua con dietilpicrocarbonato (DEPC) al 0.1%.

La concentración de RNA total se determinó por espectrofotometría a 260 nm utilizando un espectrofotómetro Beckman Du^R (Fuller Town, Cal., EUA), mediante la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Absorbancia a 260 nm} \times 250 \times 40\mu\text{g}}{1000\mu\text{l}} = \mu\text{g}/\mu\text{l}$$

250 es el factor de dilución ($1\ \mu\text{l}$ de RNA + $249\ \mu\text{l}$ de agua con DEPC)

$40\ \mu\text{g}$ de RNA / $1000\ \mu\text{l}$ = 1 Densidad Óptica

La calidad del RNA se evaluó al realizar cada lectura a 260 y 280 nm. La relación óptima debe ubicarse en un intervalo entre 1.8 a 2.0 y la integridad del RNA se evaluó por electroforesis en gel de agarosa al 1%, en condiciones desnaturizantes [25 ml de formaldehído al 37% y 15 ml de ácido 3-morfolino propanensulfónico (MOPS 10X)] (Figura 5).

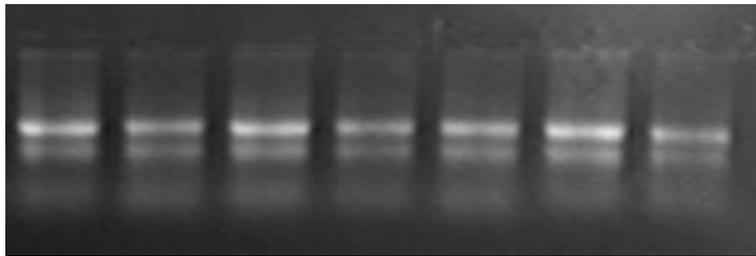


Figura 5. Imagen representativa de diferentes muestras de RNA total en un gel de agarosa en condiciones desnaturizantes.

4. Síntesis de Ácido Desoxiribonucleico Complementario

De cada uno de los RNA totales obtenidos en optimas condiciones se realizó la síntesis del ácido desoxirribonucleico complementario (cDNA), utilizando el estuche Super Script[®] First-Strand Synthesis System for RT-PCR, (Invitrogen)

como se describe a continuación: en un tubo de capacidad de 200 μ l, de pared delgada, se colocaron 200 ng de la muestra de RNA obtenida para realizar la síntesis de cDNA para el CYP1A1, y 500 ng para la síntesis de cDNA para el CYP3A7. Posteriormente, se agregó 1 μ l del oligo dT (0.5 μ g/ μ l), 1 μ l de la mezcla de dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) a la concentración de 10 mM y 10 μ l de agua con DEPC por cada reacción.

Se colocaron en un termociclador Perkin Elmer (Norwalk, CT, EUA) a una temperatura de 65° C por 5 minutos; posteriormente se adicionaron 2 μ l del buffer RT (Tris-HCl 200 mM, KCl 500 mM), 4 μ l del cloruro de magnesio (25 mM), 2 μ l de Ditiotreitól (0.1M) y 1 μ l del inhibidor de RNasas (40 U/ μ l) y se incubó a 42° C por 2 minutos, para posteriormente adicionar 1 μ l de la enzima Super Script® II (50 U/ μ l), a 42° C por 50 minutos y posteriormente a 70° C por 15 minutos. A continuación se añadió 1 μ l de RNasa H (2 U/ μ l) y se llevó a 37° C por 20 minutos. Se almacenó a -20° C para posteriormente someter las muestras a la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real.

5. PCR en tiempo real.

Las muestras de cDNA sintetizadas se sometieron a la técnica de PCR en tiempo real empleando el estuche Taq Man Gene Expression Assay®, siguiendo el protocolo de Applied Biosystem (Santa Cruz, Cal. EUA). En una placa de 96 pozos

para PCR en tiempo real se agregaron 5 μl de la mezcla universal de Taq Man^R para PCR (20X); a continuación se añadieron 0.6 μl de la sonda (20X) para cada uno de los genes, CYP1A1 y CYP3A7, por último se adicionaron 1.6 μl del cDNA previamente obtenido y 2.8 μl de agua libre de RNasas, para obtener un volumen final de 10 μl por reacción (1X).

Para realizar el PCR en tiempo real se utilizó un termociclador modelo AbiPrism 7000 de Applied Biosystems (Foster City, Cal, EUA); en el termociclador se activa la uracil-N-glucosilasa (UNG) durante 2 minutos a 50° C y 10 minutos a 95° C, se inicia el ciclo 15 segundos a 95° C y por último 1 minuto a 60° C. Este ciclo se repite por 45 veces.

Para la normalización de la técnica se utilizó el gen constitutivo β -actina y como control negativo se adicionaron todos los componentes antes mencionados, excepto la muestra de cDNA.

6. Análisis estadístico

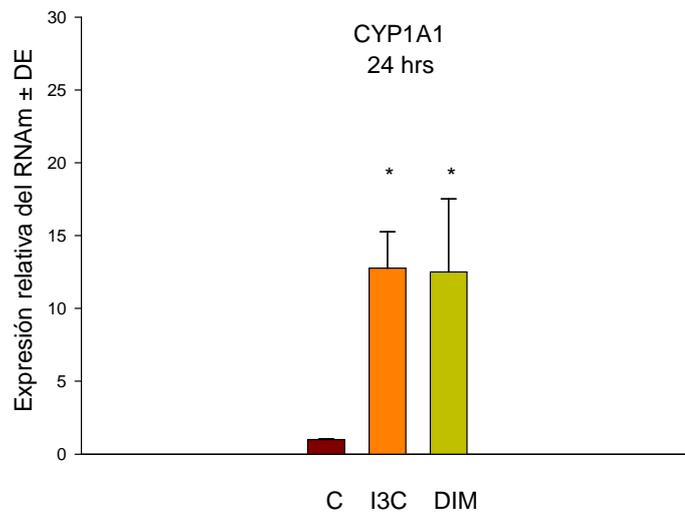
Los resultados obtenidos se analizaron estadísticamente con la prueba de ANOVA empleando el software Sigma Plot de Systat Software, Inc. (San José, Cal. EUA). Los resultados se expresan como la media \pm la Desviación Estandar (DE) de 5 experimentos cada uno en triplicado.

RESULTADOS

La determinación de la viabilidad celular empleando el método de exclusión con azul tripan demostró 100% de viabilidad, ya que no se observaron células teñidas de color azul.

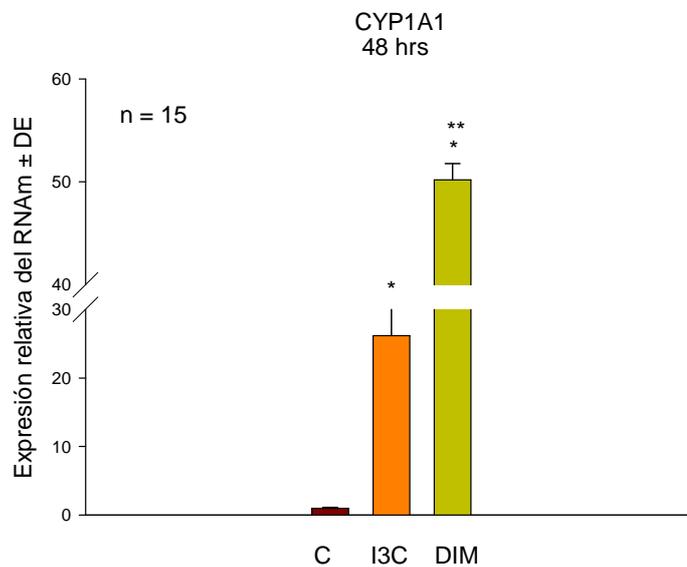
Efecto del I3C y DIM sobre la expresión relativa del RNA_m del gen CYP1A1 a diferentes tiempos de incubación.

Los resultados de los experimentos realizados para determinar en forma comparativa, el efecto de I3C y DIM, en idénticas condiciones de concentración (10 µM) y 24 hrs. de incubación, sobre la expresión relativa del RNA_m del gen CYP1A1, en la línea celular MDA-MB 231 de cáncer mamario y mediante la técnica de PCR en tiempo real, demostraron que ambos indoles fueron capaces de incrementar significativamente ($P \leq 0.05$) y con idéntica potencia, la expresión del gen con respecto a la expresión observada en los experimentos de control en los que las células se incubaron únicamente con el medio de cultivo. El incremento de la expresión relativa del gen, inducido por I3C y DIM fue por lo menos de 15.4 veces, como puede observarse en la gráfica 1. No se observó diferencia entre la expresión del gen CYP1A1 inducida por el I3C y el DIM.



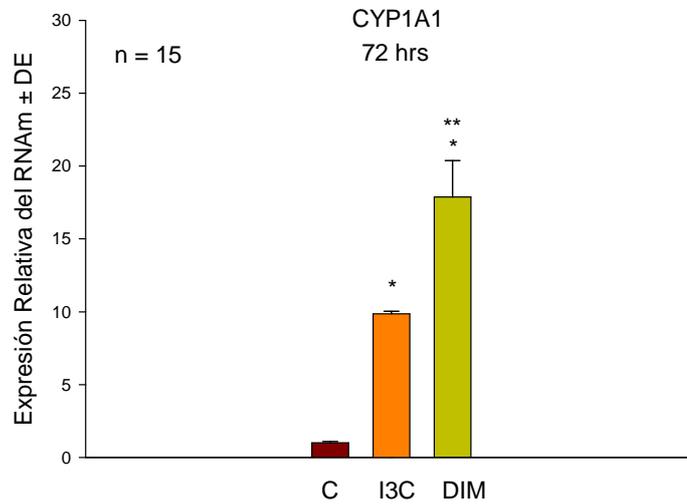
Grafica 1. Efecto de I3C y DIM sobre la expresión del gen CYP1A1 en células de cáncer de mama MDA-MB 231. Las células se incubaron durante 24 horas en presencia de una concentración 10 μ M de cada uno de los indoles, en condiciones experimentales idénticas. Los resultados se expresan como el número de veces que se incrementó la expresión del CYP1A1 con respecto a la expresión del gen en los experimentos de control, a los que se les asignó un valor de 1. Cada barra representa la media \pm DE de cinco experimentos por triplicado. *I3C v.s Células control $P \leq 0.05$, *DIM v.s. Células control $P \leq 0.05$.

La determinación del efecto del tratamiento por 48 hrs. con I3C sobre la expresión relativa del RNA_m del gen CYP1A1 en la línea celular de cáncer de mama MDA-MB 231, demostró un aumento significativo ($P \leq 0.001$) en la expresión del gen con respecto al control. El incremento inducido por el I3C fue de 26.5 veces, como puede observarse en la gráfica 2. La evaluación, del efecto del DIM sobre la expresión relativa de CYP1A1, en las mismas condiciones experimentales, mostró un aumento significativo ($P \leq 0.001$) de 50 veces la expresión del gen, con respecto a la expresión observada en los experimentos control y exhibió una potencia dos veces mayor ($P \leq 0.01$) que el I3C, como se muestra en la gráfica 2.



Grafica 2. Efecto de I3C y DIM sobre la expresión del gen CYP1A1 en células de cáncer de mama MDA-MB 231. Las células se incubaron durante 48 horas en presencia de una concentración 10 μ M de cada uno de los indoles, en condiciones experimentales idénticas. Los resultados se expresan como el número de veces que se incrementó la expresión del CYP1A1 con respecto a la expresión del gen en los experimentos de control, a los que se les asignó un valor de 1. Cada barra representa la media \pm DE de cinco experimentos por triplicado. *I3C v.s Células control $P \leq 0.001$, *DIM v.s. Células control $P \leq 0.001$, ** DIM v.s. I3C $P \leq 0.01$.

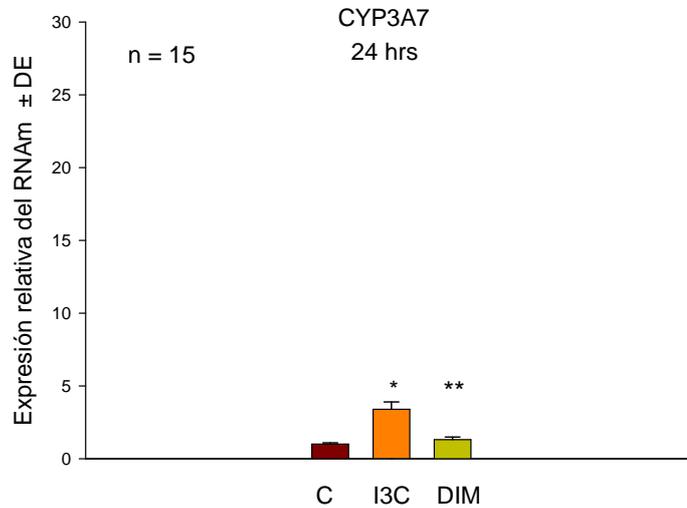
Los resultados del efecto del tratamiento de la línea celular de cáncer mamario MDA-MB 231, con I3C durante 72 horas de incubación, evaluado mediante PCR en tiempo real, sobre la expresión relativa del RNA_m del gen CYP1A1 mostraron que el I3C fue capaz de aumentar la expresión del gen de forma significativa ($P \leq 0.05$) con respecto a las células incubadas solo con medio de cultivo. El aumento de la expresión fue 10 veces mayor, como se muestra en la grafica 3. Por otra parte, el DIM, bajo las mismas condiciones experimentales, ejerció un efecto significativo ($P \leq 0.05$) sobre la expresión del gen CYP1A1, incrementándola 20 veces (Gráfica 3) con respecto a la expresión que mostraron los experimentos control. Los experimentos también mostraron que el DIM presentó un efecto dos veces más potente ($P \leq 0.05$) que el I3C, sobre la expresión relativa del RNA_m del gen CYP1A1 (Gráfica 3).



Grafica 3. Efecto de I3C y DIM sobre la expresión del gen CYP1A1 en células de cáncer de mama MDA-MB 231. Las células se incubaron durante 72 horas en presencia de una concentración 10 μ M de cada uno de los indoles, en condiciones experimentales idénticas. Los resultados se expresan como el número de veces que se incrementó la expresión del CYP1A1 con respecto a la expresión del gen en los experimentos de control, a los que se les asignó un valor de 1. Cada barra representa la media \pm DE de cinco experimentos por triplicado. *I3C v.s Células control $P \leq 0.05$, *DIM v.s. Células control $P \leq 0.05$, **DIM v.s. I3C $P \leq 0.05$.

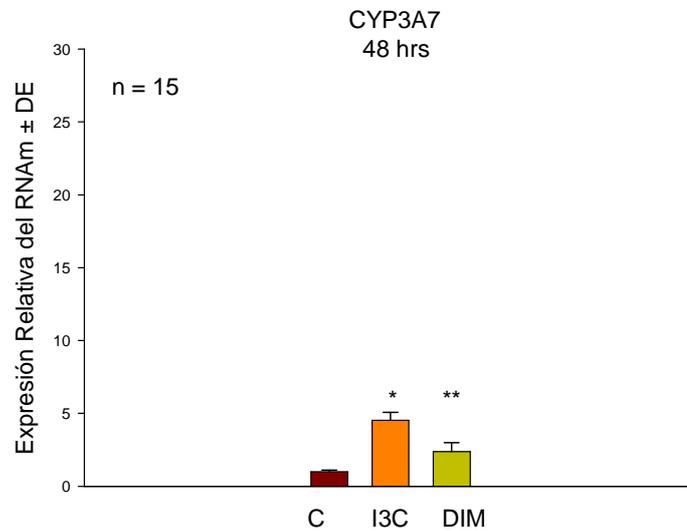
Efecto del I3C y DIM sobre la expresión relativa del RNA_m del gen CYP3A7 a diferentes tiempos de incubación.

Los resultados de los experimentos realizados para determinar el efecto del I3C durante 24 hrs. de incubación sobre la expresión relativa del RNA_m del gen CYP3A7 en la línea celular MDA-MB 231 de cáncer mamario utilizando la técnica de PCR en tiempo real, demostraron que el I3C fue capaz de incrementar significativamente ($P \leq 0.05$) la expresión del gen con respecto a la expresión observada en los experimentos control con células incubadas únicamente con medio de cultivo. Este incremento fue de 4 veces como se puede apreciar en la grafica 4. Por otra parte, cuando los cultivos celulares se trataron durante 24 horas con el DIM, bajo las mismas condiciones experimentales, se observó que el DIM fue incapaz de incrementar la expresión del gen CYP3A7, con respecto a las células control y a las células tratadas con I3C (Gráfica 4).



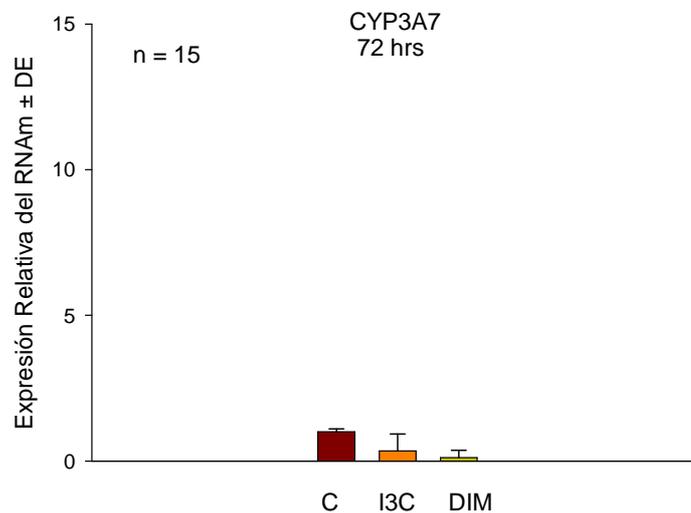
Grafica 4. Efecto de I3C y DIM sobre la expresión del gen CYP3A7 en células de cáncer de mama MDA-MB 231. Las células se incubaron durante 24 horas en presencia de una concentración 10 μ M de cada uno de los indoles, en condiciones experimentales idénticas. Los resultados se expresan como el número de veces que se incrementó la expresión del CYP3A7 con respecto a la expresión del gen en los experimentos de control, a los que se les asignó un valor de 1. Cada barra representa la media \pm DE de cinco experimentos por triplicado. *I3C v.s Células control $P \leq 0.05$, **DIM v.s. I3C $P \leq 0.05$.

Los resultados de los experimentos realizados para evaluar, el efecto del I3C, incubado por 48 hrs. con la línea celular de cáncer mamario MDA-MB231, sobre la expresión relativa del gen CYP3A7, demostraron que el I3C indujo un incremento significativo ($P \leq 0.05$) de 5 veces de la expresión del gen con respecto a las células control, como se puede apreciar en la gráfica 5. Con respecto a las células de cáncer de mama que fueron incubadas con DIM, bajo idénticas condiciones experimentales, los resultados obtenidos mostraron que el DIM fue capaz de incrementar en solo 3 veces ($P \leq 0.05$) la expresión relativa del RNA_m del gen CYP3A7, mostrando un efecto menor que el exhibido por el I3C, como lo muestra la grafica 5.



Grafica 5. Efecto de I3C y DIM sobre la expresión del gen CYP3A7 en células de cáncer de mama MDA-MB 231. Las células se incubaron durante 48 horas en presencia de una concentración 10 μ M de cada uno de los indoles, en condiciones experimentales idénticas. Los resultados se expresan como el número de veces que se incrementó la expresión del CYP3A7 con respecto a la expresión del gen en los experimentos de control, a los que se les asignó un valor de 1. Cada barra representa la media \pm DE de cinco experimentos por triplicado. *I3C v.s Células control $P \leq 0.05$, **DIM v.s. I3C $P \leq 0.05$.

Los resultados de los tratamientos por 72 horas de las células MDA-MB231 con I3C y DIM, sobre la expresión relativa del RNA_m del gen CYP3A7, demostraron falta total de efecto de ambos indoles para incrementar la expresión del gen CYP3A7 con respecto a la expresión observada en los experimentos de control. Los valores relativos observados fueron aun menores que los de los experimentos control (Gráfica 6).



Gráfica 6. Efecto de I3C y DIM sobre la expresión del gen CYP3A7 en células de cáncer de mama MDA-MB 231. Las células se incubaron durante 72 horas en presencia de una concentración 10 µM de cada uno de los indoles, en condiciones experimentales idénticas. Los resultados se expresan como el número de veces que se incrementó la expresión del CYP3A7 con respecto a la expresión del gen en los experimentos de control, a los que se les asignó un valor de 1. Cada barra representa la media ± DE de cinco experimentos por triplicado.

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este trabajo experimental demostraron que en la línea celular de cáncer mamario MDA-MB 231, los indoles I3C y DIM tienen la capacidad de modificar la expresión relativa del RNAm de los genes CYP1A1 y CYP3A7 que codifican a la 2-hidroxilasa y a la 16 α -hidroxilasa respectivamente.

Los tratamientos de las células MDA-MB 231 durante 24 horas con I3C y DIM, demostraron la capacidad de estos indoles para incrementar, con idéntica potencia, la expresión del gen CYP1A1, potencia que se incrementó en función del tiempo de exposición a los tratamientos como se observó a las 48 hrs. Un hallazgo importante es que el DIM mostró una potencia dos veces mayor que la del I3C. Esta diferencia en la potencia puede ser atribuida a la diferente afinidad de los indoles por el receptor de los hidrocarburos de arilo (AHR), a través del cual van a ejercer su acción. En efecto, reportes previos realizados en la línea celular de cáncer de mama MCF-7 y en hígado de ratón de la cepa C57BL/6J, han demostrado que, debido a su estructura química, el DIM presenta mayor afinidad por el receptor AHR que el I3C (Bjeldanes *et al.*, 1991; Wang *et al.*, 2006).

En contraste con lo observado en los experimentos realizados durante 24 y 48 hrs. en los cuales la expresión del gen se incrementó en función del tiempo de tratamiento, la administración de I3C y DIM durante 72 hrs. indujo una respuesta notoriamente menor, aún cuando se mantuvo la misma relación de la potencia

(2:1) entre el efecto del DIM y el I3C. Los resultados obtenidos en el presente trabajo, concuerdan con los informes de la literatura que reportan disminución en el efecto del I3C sobre la expresión relativa del gen CYP1A1 en hígado y glándula mamaria de ratas Sprague-Dawley, cuando los animales se trataron por tiempo prolongado (Horn *et al.*, 2002). El examen de los factores que regulan el mecanismo intracelular por el cual los indoles inducen la expresión del gen CYP1A1, puede proporcionar una explicación adecuada a los resultados obtenidos. Los indoles I3C y DIM al introducirse a la célula sobre la que van a ejercer su acción, requieren unirse a receptores citoplasmáticos de moléculas de hidrocarburos de arilo (AHR), los cuales juegan un importante papel en el metabolismo de xenobióticos (carcinógenos químicos, drogas terapéuticas) y compuestos endógenos como los estrógenos, ya que van a regular la expresión de algunas enzimas como la 2-hidroxilasa. Una vez que los indoles se unen en el citoplasma a los AHR, éstos se disocian de sus proteínas de choque térmico y chaperonas HSP90, XAP2, que les permite permanecer estables. El complejo indol-AHR se introduce al núcleo en donde forma un heterodímero con la proteína translocadora de los hidrocarburos de arilo (ARNT). El heterodímero AHR/ARNT se une a elementos de respuesta a xenobióticos (XRE) ubicados en la región promotora del gen CYP1A1 e inicia la transcripción del gen que codifica a la 2-hidroxilasa (Figura 6). Sin embargo, la transcripción del CYP1A1 puede ser inhibida por el factor represor de los hidrocarburos de arilo (AHRR) el cual también está presente en el núcleo y forma un dímero con el ARNT (ARNT/AHRR) que actúa deteniendo la transcripción iniciada en XRE al competir con el AHR para la

formación del heterodímero AHR/ARNT. De tal manera que cuando el I3C o el DIM se unen al AHR e inducen la expresión del gen, también inducen la expresión del gen del AHRR que compite por la unión a ARNT, disminuyendo la formación del complejo AHR/ARNT e inhibiendo la transcripción del CYP1A1, presentándose un mecanismo de retroalimentación negativa (Sogawa y Fujii-Kuriyama 1997, Androutsopoulos *et al.*, 2009).

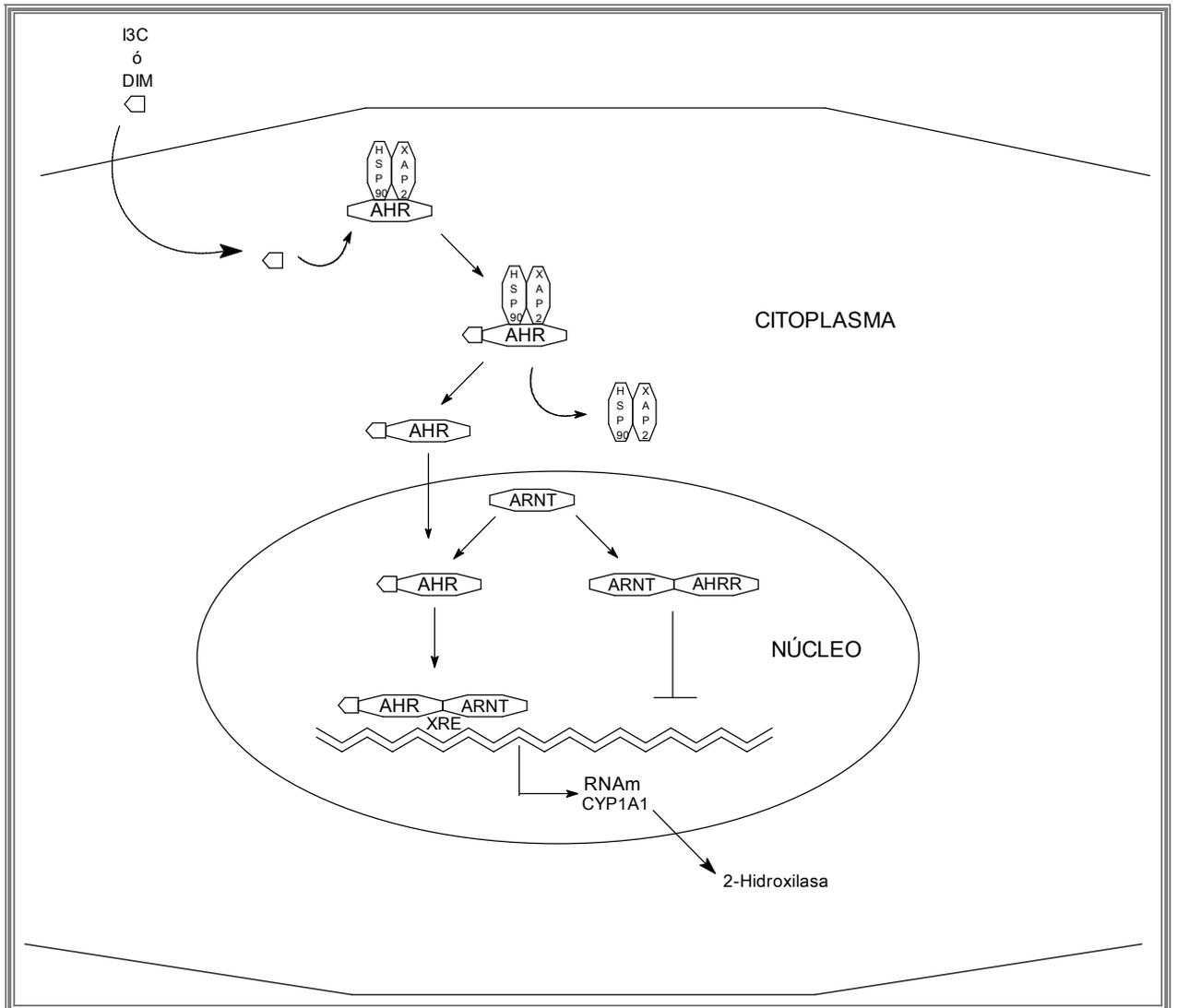


Figura 6. Mecanismo de regulación de la expresión de CYP1A1 en la glándula mamaria, mediado por la unión de I3C o DIM al receptor de hidrocarburos de arilo (AHR). HSP90, proteína de choque térmico; XAP2, proteína cochaperona; ARNT, translocador nuclear de AHR; XRE, elemento de respuesta a xenobióticos y AHRR, represor del receptor de los hidrocarburos de arilo.

Otra posible explicación para la disminución de la expresión del CYP1A1 a 72 hrs. puede encontrarse en la capacidad del I3C y DIM de inhibir la síntesis de DNA. En un estudio realizado en líneas celulares de cáncer de mama MCF-7 y MDA-MB 231, se observó la inhibición de la síntesis de DNA y de la proliferación celular de manera dependiente del tiempo (Hong *et al.* 2002). Por otra parte se ha reportado en la literatura que el I3C y el DIM tienen la capacidad de inducir arresto del ciclo celular en la fase de G1. Estudios realizados en líneas celulares de cáncer de mama y próstata demuestran este hecho. La transición de la fase G1 a la fase S es controlada por la activación de CDK 4/6 ciclina D1 y CDK2/ciclina E y por la fosforilación de la proteína Rb. El I3C y el DIM incrementan la expresión de los inhibidores de CDKs *p21* y *p27*. La inhibición de CDK4/6 ciclina D1 y CDK2 ciclina E disminuye la fosforilación de la proteína Rb, la cual se une al factor de transcripción E2F. Este secuestro del factor E2F bloquea la transcripción de los genes de la fase S, resultando en el arresto del ciclo celular en la fase G1 [Figura 7] (Kim y Milner 2005, Weng *et al.*, 2008; Androutsopoulos *et al.*, 2009).

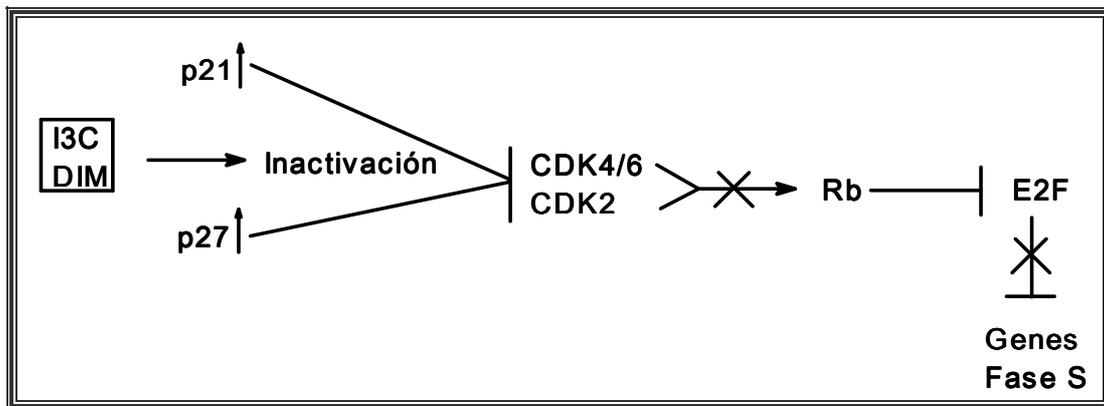


Figura 7. Efecto del I3C y DIM sobre el arresto del ciclo celular en la fase G1. El I3C y el DIM incrementan la actividad de p27 y p21, inhibidores de CDK4/6 (ciclina D1) y de CDK2 (ciclina E) las cuales son las responsables de la fosforilación de la proteína del retinoblastoma (Rb). Esta hipofosforilación impide su unión al factor de transcripción E2F con lo cual se impide la transcripción de los genes de la fase S induciendo así el arresto del ciclo celular en G1.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo experimental, confirman y amplían un estudio previo realizado por nuestro grupo de investigación, en donde se observó el efecto de I3C y el DIM sobre el metabolismo del E_2 y de la E_1 en la misma línea celular de cáncer mamario MDA-MB 231. En este estudio se demostró claramente que los indoles incrementan la formación de metabolitos 2-hidroxilados de los estrógenos, siendo el DIM el compuesto con mayor potencia biológica.

En el presente estudio se demuestra por primera vez el efecto de I3C y DIM sobre la expresión del gen CYP3A7 que codifica a la 16 α -hidroxilasa, enzima que cataliza la introducción de un grupo hidroxilo en el carbono 16, en orientación α , en las moléculas de estrona y estradiol.

El efecto del tratamiento de las células MDA-MB 231 con I3C durante 24 hrs., sobre la expresión relativa del RNAm del gen CYP3A7 fue totalmente diferente al efecto observado con el tratamiento con DIM. Mientras el I3C indujo incremento en la expresión, el DIM no modificó la expresión del gen con respecto al control.

La respuesta de la expresión relativa del RNAm del gen CYP3A7 al tratamiento de las células MDA-MB 231 con I3C por 48 hrs., fue muy moderada y sorprendentemente la expresión del gen CYP 3A7 inducida por DIM fue menor que la inducida por el I3C contrariamente a los efectos observados en los tratamientos de los indoles sobre la expresión del gen CYP1A1.

Los resultados de los tratamientos por 72 hrs. con I3C y DIM no sólo demostraron una falta de respuesta de la expresión si no que estos indoles muestran una notoria inhibición de la expresión del gen CYP3A7 ya que los valores obtenidos de RNAm se muestran por debajo de los valores de los experimentos control.

Como se mencionó anteriormente, el efecto de los indoles sobre la expresión del CYP3A7, no ha sido descrita en la literatura, sin embargo la regulación de la expresión de los genes de la familia 3A ha sido asociada al receptor X de pregnanos (PXR), también llamado SXR o NR1I2 (Bertilsson *et al.* 2001, Chen *et al.* 2007), no obstante la vía por la cual se lleva acabo esta regulación es aún desconocida. La expresión del receptor PXR ha sido reportada en hígado, intestino grueso y delgado, cáncer de endometrio, y además tanto en tejido mamario sano como en tejido mamario neoplásico humano (Dotzlaw *et al.* 1999, Miki *et al.* 2006), así mismo la expresión del gen CYP3A7, ha sido reportada en la mama, la placenta, el pulmón, el riñón, así como en algunos tipos de cáncer como el de endometrio y mama (Bertilsson *et al.* 2001).

Una posible explicación de la inhibición de la expresión del CYP3A7 por los indoles I3C y DIM, puede encontrarse en una similitud a la capacidad del sulforofano, un isiotiocianato que al igual que los indoles es un componente de las verduras crucíferas, del genero *Brassica*, que inhibe la expresión de uno de los genes de la familia 3A, el CYP3A4; este CYP presenta un 95% de homología con el CYP3A7 (de Wildt *et al.*, 1999; Bertilsson *et al.*, 2001). El sulforofano proviene de la hidrólisis de los isiotiocianatos, que al ser hidrolizados por la enzima mirosinasa, forman al sulforofano. En cultivos de hepatocitos humanos ha sido reportado que el sulforofano disminuye la transcripción del gen CYP3A4 (Mahéo *et al.*, 1997), además ha sido reportado como antagonista natural del receptor PXR en cultivos

de hepatocitos humanos, inhibiendo la interacción del receptor PXR con sus coactivadores (Zhou *et al.*, 2007).

Nuevamente los resultados de este estudio confirman y amplían los hallazgos previos de nuestro grupo de investigación en los experimentos del efecto del I3C y el DIM sobre el metabolismo de estrógenos en las células de cáncer mamario MDA-MB 231, en donde la presencia de los indoles no incrementó la formación de 16 α hidroxiestrona, metabolito que ha sido asociado con el incremento del riesgo de cáncer de mama debido a que se une covalentemente con el receptor intracelular de estrógenos e induce estímulos de tipo estrogénico por tiempo prolongados.

Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis demuestran claramente que el I3C y DIM tienen la capacidad de modificar la expresión de los genes CYP1A1 y CYP3A7, siendo el DIM el compuesto con mayor potencia biológica para incrementar la expresión del gen CYP1A1 que codifica a la enzima 2 hidroxilasa, así como para inhibir al gen CYP3A7 que codifica a la enzima 16 α -hidroxilasa, planteando la posibilidad, de disponer de una estrategia que favorezca la formación de metabolitos 2-hidroxilados de estrógenos, con baja potencia biológica, al mismo tiempo que reduzca la formación de metabolitos 16 α -hidroxilados, contribuyendo a disminuir uno de los factores de riesgo a

padecer cáncer mamario, siendo necesario realizar un mayor numero de estudios que aporten evidencias a nivel de investigación clínica de los efectos de los indoles sobre los metabolitos de estrogenos 2 y 16 alfa hidroxilados.

CONCLUSIONES

- El I3C y el DIM tuvieron la capacidad de modificar la expresión de los genes *CYP1A1* y *CYP3A7* en las células de cáncer mamario MDA-MB 231.
 - El DIM demostró tener una mayor potencia biológica para incrementar la expresión del gen *CYP1A1* en comparación con el I3C.
 - La mayor expresión del gen *CYP1A1* se alcanzó cuando la línea celular de cáncer de mama MDA-MB 231 fue incubada 48 hrs. con el I3C y con el DIM.
 - El I3C demostró tener mayor efectividad para aumentar la expresión del gen *CYP3A7* en comparación con el DIM.
 - La mayor expresión del *CYP3A7* se alcanzó a las 48 hrs. de incubación de los indoles I3C y DIM con las células de cáncer de mama.
 - Los indoles I3C y DIM demostraron ser más efectivos para incrementar la expresión del gen *CYP1A1* que para incrementar la expresión del *CYP3A7*.
 - El DIM fue capaz de inhibir la expresión del gen *CYP3A7* a las 72 hrs. de haber sido incubado con las células de cáncer de mama.
-
-

REFERENCIAS

Adlercreutz H (1990) Western diet and Western diseases: some hormonal and biochemical mechanisms and associations. **Scand J Clin Lab Invest**; 201: 3-21.

Androutsopoulos VP, Tsatsakis AM, Spandidos DA (2009) Cytochrome P450 CYP1A1: wider roles in cancer progression and prevention. **BMC Cancer**; 9:187-204.

Bertilsson G, Berkenstam A, Blomquist P (2001) Functionally conserved xenobiotic responsive enhancer in Cytochrome P450 3A7. **Biochem Biophys Res Comm**; 280:139-144.

Bjeldanes LF, Kim JY, Grose KR, Bartholomew JC, Bradfield CA (1991) Aromatic hydrocarbon responsiveness-receptor agonists generated from chlorodibenzo-*p*-dioxin. **Proc Natl Acad Sci USA**; 88:9543-9547.

Bradlow HL, Telang NT, Sepkovic DW, Osborne MP (1996) 2-hydroxyestrone: the 'good' estrogen. **J Endocrinol**; 150:S259-S265.

Brodie A (2002) Aromatase inhibitors in breast cancer. **Trends in Endocrinol**; 13: 61-65.

Brueggemeier RW, Hackett JC, Diaz-Cruz ES (2005) Aromatase Inhibitors in the Treatment of Breast Cancer. **Endocrin Rev**; 26: 331-345.

Bulun SE, Price TM, Mahendroo MS, Aitken J, Simpson ER (1993) A link between breast cancer and local estrogen biosynthesis suggested by quantification of breast adipose tissue aromatase cytochrome P450 transcripts using competitive polymerase chain reaction after reverse transcription. **J Clin Endocrinol Metab**; 77: 1622-1628.

Chen Y, Tang Y, Wang MT, Zeng S, Nie D (2007) Human pregnane X receptor and resistance to chemotherapy in prostate cancer. **Cancer Res**; 67:10361-10367.

Coker AL, Crane MM, Sticca RP, Sepkovic DW (1997) Ethnic differences in estrogen metabolism in healthy women. **J Natl Cancer Inst**; 89: 89-93.

Cover CM, Hsieh SJ, Tran SH (1998) Indole-3- carbinol inhibits the expression of cyclindependent kinase-6 and induces a G1 cell cycle arrest of human breast cancer cells independent of estrogen receptor signaling. **J Biol Chem**; 273:3838-3847.

Dally H, Bartsch H, Jager B, Edler L, Schmezer P, Spiegelhalder B, Dienemann H, Drings P, Kayser K, Svholz V, Risch A (2004) Genotype relationships in the CYP3A locus in Caucasians. **Cancer Lett**; 2007:95-99.

Davis DL, Telang NT, Osborne MP, Bradlow HL (1997) Medical hypothesis: bifunctional genetichormonal pathways to breast cancer. **Environ Health Perspect**; 105:571-576.

de Wildt SN, Kearns GL, leeder JS, van den Anker JN (1999) Cytochrome P450 3A : Ontogeny and drug disposition. **Clin Pharmacokinet**; 37: 485-505.

Di Zerga GS, Hodgen GD (1981) Folliculogenesis in the primate ovarian cycle. **Endocr Rev**; 2:27-49.

Dotzlaw H, Alkahalf M, Murphy LC (1992) Characterization of estrogen receptor variant mRNAs from human breast cancers. **Mol Endocrinol**; 6:773-782.

Dotzlaw H, Leygue E, Watson P, Murphy LC (1999) The human orphan receptor PXR messenger RNA is expressed in both normal and neoplastic breast tissue. **Clin Cancer Res**; 5:2103-2107.

Falk RT, Rossi SC, Fears TR, Sepkovic DW, Migella A, Adlercreutz H, Donaldson J, Bradlow HL, Ziegler RG (2000) A new ELISA kit for measuring urinary 2-hydroxyestrone, 16 α -hydroxyestrone, and their ratio: Reproducibility, validity, and assay performance after freeze-thaw cycling and preservation by boric acid. **Cancer Epidemiol, Biomed Preven**; 9: 81–87.

Feigelson HS, Ross RK, Yu MC, Coetzee GA, Reichardt JK, Henderson BE (1996) Genetic susceptibility to cancer from exogenous and endogenous exposures. **J Cell Biochem Suppl**; 25: 15-22.

Finta C, Zaphiropoulos PG (2000) The human cytochrome P450 3A locus. Gene evolution by capture of downstream exons. **Gene**; 260: 12-23

Fishman J, Bradlow HL, Schneider J, Anderson KE, Kappas A (1990) Radiometric analysis of biological oxidations in man: sex differences in estradiol metabolism. **Proc Natl Acad Sci**; 77: 4957-60.

Fishman J, Martucci C (1980) Biological properties of 16 α -hydroxyestrone: implications in estrogen physiology and pathophysiology. **J Clin Endocrinol Metab**; 51:611-615.

Food, Nutrition and the prevention of cancer: A global perspective World Cancer Research Foundation and American Institute for Cancer Research 1997: 252-87.

Fowke JH, Longcope C, Hebert JR (2000) *Brassica* vegetable consumption shifts estrogen metabolism in healthy postmenopausal women. **Can Epidemiol Biomed Preven**; 9:773-779.

Fugua S, Chamness GC, McGuire WL (1993) Estrogen receptor mutations in breast cancer. **J Cell Biochem**; 51:135-143.

Gibori G, Khan I, Warshaw ML, McLean MP, Puryear Anelson S, Durke TJ, Azhar S, Steinsch-Neider A, Rao MC (1988) Placental - derived regulators and the complex control of luteal cell function. **Rec Progr in Horm Res**; 44: 377-429.

Goodman AL, Hogden GD (1983) The ovarian triad of the primate menstrual cycle. **Rec Prog in Horm Res**; 39:1-73.

Guengerich FP (1999) CYTOCHROME P-450 3A4: Regulation and role in drug metabolism. **Ann Rev of Pharmacol and Toxicol**; 39: 1-17.

Harada N (1992) A unique aromatase (P450arom) mRNA formed by alternative use of tissue specific exons I in human skin fibroblast. **Biochem Biophys Res Commun**; 189:1001-1007.

Higdon JV, Delage B, Williams DE, Dashwood RH (2007) Cruciferous vegetables and human cancer risk: epidemiologic evidence and mechanistic basis. **Pharmacol Res**; 55: 224-236.

Hong C, Firestone GL, Bjeldanes LF (2002) Bcl-2 family-mediated apoptotic effects of 3,3-diindolylmethane (DIM) in human breast cancer cells. **Biochem Pharmacol**; 63: 1085-1097.

Horn TL, Mark AR, Robin LB, Danuta MG (2002) Modulations of P450 mRNA in liver and mammary gland P450 activities and metabolism of estrogen in liver by treatment of rats with indole-3-carbinol. **Biochem Pharmacol**; 64:393-404.

Hulka BS, Stark AT (1995). Breast cancer: cause and prevention. **Lancet**; 346:883-887.

Instituto Nacional de Estadística Geográfica e Informática / Secretaría de Salud. Proyecciones de la Población de México, 2000 - 2050. Base de datos 2009.

Jin L, Qi M, Chen DZ (1999) Indole-3-carbinol prevents cervical cancer in human papilloma virus type 16 (HPV16) transgenic mice. **Cancer Res**; 59:3991-3997.

Kabat GC, Chang CJ, Sparano JA, Sepkovie DW, Hu XP, Khalil A (1997) Urinary estrogen metabolites and breast cancer: a case-control study. **Cancer Epidemiol Biomed Prev**; 6: 505-9.

Kim YS, Milner JA (2005) Targets for indole-3-carbinol in cancer prevention. **J of Nutr Biochem**; 16:65-73.

Kisselev P, Schunck WH, Roots I, Schwarz D (2005) Association of CYP1A1 polymorphisms with differential metabolic activation of 17 β -estradiol and estrone. **Cancer Res**; 65: 2972-2978.

Lampe JW, Peterson S (2002) *Brassica*, biotransformation and cancer risk: genetic polymorphism alter the preventive effects of cruciferous vegetables. **J Nutr**; 132:2991-2994.

Lee AJ, Cai MX, Thomas PE, Conney AH, Zhu BT (2003a) Characterization of the oxidative metabolites of 17 β -estradiol and estrone formed by 15 selectively expressed human Cytochrome P450 isoforms. **Endocrinology**; 144:3382–3398.

Lee AJ, Conney AH, Zhu BT (2003b) Human Cytochrome P450 3A7 has a distinct high catalytic activity for the 16 α -hydroxylation of estrone but not 17 β -estradiol. **Cancer Res**; 63:6532-6536.

Lipper TH, Seeger H, Mueck AO (2000) The impact of endogenous estradiol metabolites on carcinogenesis. **Steroids**; 65:357-369.

Lord R, Bradley B, Brallell A (2002) Estrogen metabolism and the diet-cancer connection: rationale for assessing the ratio of urinary hydroxylated estrogen metabolites. **Alt Med Rev**; 7:112-129.

Mahendroo MS, Means GD, Mendelson CR, Simpson ER (1991) Tissue-specific expression of human P450_{arom}: The promoter responsible for expression in adipose is different from that utilized in placenta. **J Biol Chem**; 266: 11276-11281.

Mahéo K, Morel F, Langouet S, Kramer H, Le ferrec E, Ketterer B, Guillouzo A (1997) Inhibition of cytochromes P-450 and induction of glutathione s-transferases by sulforaphane in primary human and rat hepatocytes. **Cancer Res**; 57: 3649-3652.

Masson LF, Sharp L, Cotton SC, Little J (2005) Cytochrome P-450 1A1 gene polymorphisms and risk of breast cancer: A huge Review. **Am J Epidemiol**; 161: 901-915.

Martucci C, Fishman J (1977) Direction of estradiol metabolism as a control of its hormonal action-uterotrophic activity of estradiol metabolite. **Endocrinology** 101: 1709-1715.

Means GD, Kilgore MW, Mahendroo MS, Mendelson CR, Simpson ER (1991) Tissue-specific promoters regulate aromatase cytochrome P450 gene expression in human ovary and fetal tissues. **Mol Endocrinol**; 5:2005-2013.

Meilahn EN, De Stavola B, Allen DS, Fentiman I, Bradlow HL, Sepkovic DW (1998) Do urinary oestrogen metabolites predict breast cancer? Guernsey III cohort follow - up. **Br J Cancer**; 78: 1250-5.

Meng Q, Qi M, Chen DZ, (2000) Suppression of breast cancer invasion and migration by indole-3-carbinol: associated with upregulation of BRCA1 and E-cadherin/catenin complexes. **J Mol Med**; 78:155-165.

Michnovicz JJ, Bradlow HL (1990) Induction of estradiol metabolism by dietary indole-3-carbinol in humans. **J Natl Cancer Inst**; 82:947-949.

Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, Futreal PA, Hershmann K, Tavtigian S (1994) A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. **Science**; 266: 66-71.

Miki Y, Suzuki T, Kitada K, Yabuki N, Shibuya R, Moriya T, Ishida T, Ohuchi N, Blumberg B, Sasano H (2006) Expression of steroid and xenobiotic receptor and its possible target gene, organic anion transporting polypeptide-A, in human breast carcinoma. **Cancer Res**; 66:535-542.

Miksicek RJ, Lei Y, Wang Y (1993) Exon skipping gives rise to alternatively spliced forms of the estrogen receptor in breast tumor cells. **Breast Cancer Res Treat**; 26:163-169.

Muti P, Bradlow HL, Micheli A (2000) Estrogen metabolism and risk of breast cancer: a prospective study of the 2:16 alpha hydroxyestrone ratio in premenopausal and postmenopausal women. **Epidemiology**; 11:635-640.

Nao CW, Jeffery E (2001) The synergistic upregulation of phase II detoxification enzymes by glucosinolates breakdown products in cruciferous vegetables. **Toxicol and Applied Pharmacol**; 174:146-152.

Nelson DR (1999) Cytochrome P450 and the Individuality of Species. **Arch of Biochem Biophys**; 369: 1-10.

Niwa T, Swaneck G, Bradlow HL. (1994) Alterations in estradiol metabolism in MCF-7 cells induced by treatment with indole-3-carbinol and related compounds. **Steroids**; 59:523-527.

Pérez-Palacios G (1996) El programa de salud reproductiva en el marco de la política de población. En: Transición Mexicana. Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. pp. 298-301.

Porter P (2008) "Westernizing" Women's Risk? Breast Cancer in Lower-Income Countries. **N Engl J Med**; 358; 3.

Simpson ER, Mahendroo MS, Means GD, Kilgore MW, Hinshelwood MM, Graham-Lorence S (1996) Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. **Endocr Rev**; 15: 342-55.

Sogawa K, Fujii-Kuriyama (1997) Ah Receptor, a novel ligand-activated transcription factor. **J Biochem**; 122:1075-1079.

Suto A, Bradlow HL, Wong GY (1993) Experimental down-regulation of intermediate biomarkers of carcinogenesis in mouse mammary epithelial cells. **Breast Cancer Res Treat**; 27:193-202.

Swaneck GE, Fishman J (1988) Covalent binding of the endogenous estrogen 16 α -hydroxyestrone to estradiol receptor in human breast cancer cells: Characterization and intranuclear localization. **Proc Natl Acad Sci USA**; 85: 7381-7835.

Telang NT, Suto A, Wong GY (1992) Induction by estrogen metabolite 16 alpha hydroxyestrone of genotoxic damage and aberrant proliferation in mouse mammary epithelial cells. **J Natl Cancer Inst**; 84:634-638.

Telang NT, Katdare M, Bralow HL (1997) Inhibition of proliferation and modulation of estradiol metabolism: novel mechanisms for breast cancer prevention by the phytochemical indole-3-carbinol. **Proc Soc Exp Biol Med**; 216:246-252.

Wang TY, Milner MJ, Milner JA, Kim YS (2006) Estrogen receptor α as a target for indole-3-carbinol. **J Nutr Biochem**; 17:659-664.

Weng JR, Tsai CH, Kulp SK, Chen CS (2008) Indole-3-carbinol as a chemopreventive and anti-cancer agent. **Cancer Lett**; 262:153-163.

Wooster R, Bignell G, Lancaster J, Swift S, Seal S, Mangion J. (1995) Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. **Nature**; 378: 789-92.

Yoo HJ, Sepkovic DW, Bradlow HL (2001) Estrogen metabolism as a risk factor for head and neck cancer. **Otolaryngol Head Neck Surg**; 124:241-247.

Yoshida M., Katashima S., Ando J., Tanaka T. , Uematsu F., Nakae D., Maekawa A. (2004) Dietary indole-3-carbinol promotes endometrial adenocarcinoma development in rats initiated with N-ethyl-N0-nitro-N-nitrosoguanidine, with induction of cytochrome P450 in the liver and consequent modulation of estrogen metabolism. **Carcinogen**; 25 : 2257-2264.

Yue W, Wang JP, Hamilton CJ, Demers LM, Santen RJ (1998) In situ aromatization enhances breast tumor estradiol levels and cellular proliferation. **Cancer Res**; 58: 927-32.

Zhou C, Poulton EJ, Grun F, Bammler TK, Blumberg B, Thummel KE, Eaton DL (2007) The dietary isothiocyanate sulforaphane is an antagonist of the human steroid and xenobiotic nuclear receptor. **Molec Pharmacol**; 71: 220-229.
