

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA



Modulación estrogénica de *KISS1/KISS1R* en células de cáncer de mama MCF-7

Tesis

Que para obtener el grado de
Maestro en Ciencias (Neurobiología)

Presenta

Biól. Lenin Tamay de Dios

Director de Tesis:
Dr. Gonzalo Martínez de la Escalera Lorenzo



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
Instituto de Neurobiología

Los miembros del Comité Tutorial certificamos que la tesis elaborada por: Lenin Tamay de Dios, cuyo título es: “Modulación estrogénica del sistema *KISS1/KISS1R* en células MCF-7 de cáncer de mama humano” se presenta como uno de los requisitos para obtener el grado de Maestría en Ciencias (Neurobiología) y cumple con los criterios de originalidad y calidad requeridos por la División de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Presidente

Dr. Manuel B. Aguilar Ramírez

Secretario

Dr. Gonzalo Martínez de la Escalera Lorenzo

Vocal

Dr. Andrés Quintanar Stephano

Suplente

Dra. Brenda Anguiano Serrano

Suplente

Dra. Wendy Portillo Martínez

Aprobado por el Comité Académico

Dra. Teresa Morales Guzmán
Coordinadora del Programa
Maestría en Ciencias (Neurobiología)

Este trabajo se realizó en el Departamento de Neurobiología Celular y Molecular del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), bajo la dirección del Dr. Gonzalo Martínez de la Escalera Lorenzo.

Resumen

Los estrógenos juegan funciones importantes en la fisiología reproductiva de los mamíferos. Entre éstas, destaca su participación en el desarrollo de la glándula mamaria, mientras que en condiciones patológicas como en el cáncer de mama, regulan la proliferación y progresión tumoral por medio de la activación de receptores nucleares a estrógenos, principalmente, de los receptores a estrógenos alfa que son antagonizados por la acción de Moduladores Selectivos de Receptores a Estrógenos. El descubrimiento del receptor de membrana a estrógenos GPR30, mostró una mayor complejidad de estos mecanismos, en la medida en que han aparecido reportes que proponen que el GPR30 está implicado en la progresión tumoral, además de poder ser activado por algunos moduladores como el Tamoxifeno y el 4-Hidroxitamoxifeno. La función inicial del sistema *KISS1/KISS1R*, se circunscribió al contexto del cáncer como inhibidores de la metástasis. Los estrógenos regulan tanto positiva como negativamente la expresión de *KISS1* en el hipotálamo para activar al eje reproductivo de los mamíferos. En el presente trabajo, mediante PCR en tiempo real evaluamos si el sistema *KISS1/KISS1R* es blanco génico de los estrógenos, utilizando al modelo de las células MCF-7 de cáncer de mama humano. Los resultados demuestran que *KISS1* es modulado negativamente por el 17 β -Estradiol, involucrando la participación putativa del receptor GPR30, mientras que *KISS1R* es modulado de forma positiva por el 17 β -Estradiol, acción en la que no participan los receptores membranales. Estos descubrimientos podrían tener implicaciones sobre la progresión del cáncer de mama y formación de metástasis.

Summary

Estrogen plays important roles in mammalian reproductive physiology. Amongst these are participation in the development of the mammary gland, whereas in pathological conditions such as breast cancer, regulate the proliferation and tumor progression through activation of nuclear estrogen receptors, mainly from the estrogen receptors alpha that are antagonized by the action of Selective Modulators of Estrogen Receptors. The discovery of membrane receptor for estrogen GPR30, showed a greater complexity of these mechanisms, as they have appeared reports that suggest that GPR30 is involved in tumor progression, besides being able to be activated by some modulators as Tamoxifen and 4-Hydroxytamoxifen. The initial function *KISS1/KISS1R* system was limited to the context in inhibiting cancer metastasis. Estrogens regulate both positively and negatively *KISS1* expression in the hypothalamus to activate the reproductive axis in mammals. In this paper, real-time PCR *KISS1/KISS1R* evaluate whether the system is white gene of estrogen, using the model of MCF-7 human breast cancer. The results show that *KISS1* is negatively modulated by 17β -Estradiol, involving the participation putative receptor GPR30, while *KISS1R* is positively modulated by 17β -Estradiol, in which no action involving membrane receptors. These findings may have implications for breast cancer progression and metastasis.

Agradecimientos

Quiero agradecer al Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México por darme la oportunidad de realizar mis estudios de Maestría. A la Dirección General de Estudios de Posgrado de la UNAM (Cuenta No: 509003584) así como al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Becario No: 222502) por el apoyo económico.

Deseo agradecer al Dr. Gonzalo Martínez de la Escalera Lorenzo por la oportunidad de incorporarme a su grupo de investigación así como por la asesoría en este trabajo. Al comité tutorial integrado por la Dra. Brenda Anguiano Serrano y el Dr. Francisco G. Vázquez Cuevas por sus observaciones que ayudaron a enriquecer este trabajo.

También agradezco a la Dra. Diana Caballero Hernández por su asesoría y apoyo experimental y a la Dra. Carmen Aceves Velasco por permitirme trabajar en su laboratorio. Agradezco el apoyo técnico del M. en C. Gabriel Nava Pinto y al laboratorista Antonio Prado Galán. Agradezco el apoyo administrativo de la M. en C. Leonor Casanova Rico.

Por último quiero agradecer a todos mis compañeros del laboratorio A-14 y A-15 así como a los de la maestría que formaron parte de esta experiencia.

Dedicatoria

A mis padres Tomás Tamay Naal y Francisca de Dios Ojeda, a mis hermanos Servando y Renán, así como a toda mi familia y personas que quiero mucho.

Índice

Resumen	iv
Summary	v
1. Introducción	1
2. Antecedentes	3
2.1 Estrógenos	3
2.2 Receptores a estrógenos	4
2.3 Estrógenos y cáncer de mama	7
2.4 Moduladores Selectivos de Receptores a Estrógenos (SERM's)	9
2.5 El sistema <i>KISS1/KISS1R</i> en cáncer	10
3. Planteamiento del problema	12
4. Hipótesis	13
5. Objetivos	13
5.1 General	13
5.2 Particulares	13
6. Material y métodos	14
6.1 Cultivo celular	14
6.2 Tratamientos	14
6.3 Extracción de ARN total y transcripción reversa	14
6.4 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	15

	6.5 PCR en tiempo real	15
	6.6 Estandarización de la PCR en tiempo real	18
	6.7 Análisis estadístico	20
7. Resultados		21
	7.1 Cuantificación de la expresión génica para <i>KISS1</i>	21
	7.2 Cuantificación de la expresión génica para <i>KISS1R</i>	26
8. Discusión		31
9. Conclusión		35
10. Referencias		36
11. Índice de figuras y tablas		44

1. Introducción

La fisiología de los organismos está orquestada por una gran variedad de señales endógenas y exógenas que coordinan una multitud de procesos biológicos en los seres vivos. Las hormonas forman parte de estos mecanismos de regulación. Las hormonas son mensajeros químicos que han controlado diversos procesos fisiológicos en los organismos a lo largo de la evolución. Estas moléculas coordinan funciones como el crecimiento, la alimentación, la reproducción, la sobrevivencia, el estrés, entre otros. También juegan un rol crítico en la etiología de algunas patologías, como el cáncer de mama.

Las hormonas sexuales como los estrógenos, juegan un papel crucial en el funcionamiento reproductivo de los mamíferos, así como en otros procesos fisiológicos. Su producción en el organismo depende principalmente de las gónadas (Sasano *et al.*, 1989) aunque también pueden ser sintetizados localmente en otros tejidos.

La participación de los estrógenos en la carcinogénesis de mama ha sido investigada desde hace algunos años (Henderson *et al.*, 1988). Se ha propuesto que en el cáncer de mama, intervienen promoviendo la proliferación de las células epiteliales de la glándula mamaria (Santner *et al.*, 1993). El mecanismo de acción involucra la activación de receptores nucleares a estrógenos (RE) expresados por las células tumorales, y los más estudiados son los denominados receptores a estrógenos alfa (RE α). Estos receptores son blanco farmacológico de compuestos conocidos como Moduladores Selectivos de Receptores a Estrógenos (SERM's por sus siglas en inglés), es decir, antagonizan la acción de los RE; estos compuestos frecuentemente son empleados en la clínica como terapia antiestrogénica para inhibir el crecimiento tumoral (Wen-Ling *et al.*, 2008). El descubrimiento posterior de un receptor de membrana a estrógenos conocido como GPR30, mostró que la acción de los estrógenos en este proceso podría ser más complejo de lo que originalmente se pensaba. El tema es controversial, ya que hay estudios que ponen en duda el papel del GPR30 como receptor estrogénico (Otto *et al.*, 2008, 2009).

La primera línea celular de carcinoma de mama humano metastásico, que fue creada como modelo *in vitro* para el estudio de la influencia de los estrógenos sobre el

cáncer de mama fueron las células MCF-7 (Soule *et al.*, 1973). La ventaja que ofrece esta línea celular, como modelo de estudio, es la presencia de los RE (Brooks *et al.*, 1973) y del receptor GPR30 (Carmeci *et al.*, 1997).

El receptor GPR30 que fue descrito en las células MCF-7 (Carmeci *et al.*, 1997), es activado por su agonista selectivo, el G-1 (Bologa *et al.*, 2006), por el 17 β -Estradiol (ligando endógeno), por algunos SERM's como el Tamoxifeno (Tam) y el 4-Hidroxitamoxifeno (4-Oht) (Filardo *et al.*, 2000). Funcionalmente, se ha propuesto que el GPR30 está implicado en la progresión tumoral (Filardo *et al.*, 2006).

En el contexto reproductivo, los estrógenos son indispensables para la activación del circuito hipotálamo-hipófisis-gónada, también conocido como el eje reproductivo. Recientemente, se ha descubierto la participación de un sistema de información conocido como *KISS1/KISS1R* en la regulación de este eje. El gen *KISS1* codifica a las kisspeptinas, un grupo de péptidos de diferente tamaño y peso molecular, mientras que *KISS1R* es el gen codificante del receptor de las kisspeptinas. *KISS1*, fue descrito por primera vez en el campo del cáncer, particularmente en el melanoma, como un gen supresor de metástasis (Lee *et al.*, 1996). Años más tarde, varios estudios demostraron su participación en la activación del eje reproductivo en mamíferos. En este eje, los estrógenos regulan la expresión de *KISS1* en el hipotálamo (Smith *et al.*, 2005); esta acción de los estrógenos es mediada por la activación del RE α en las neuronas kisspeptinérgicas. En el cáncer, se ha propuesto que las kisspeptinas inhiben la expresión de proteasas (Yan *et al.*, 2001), y que inducen la apoptosis en células tumorales (Navenot *et al.*, 2009); sin embargo, hasta el momento no se conoce con precisión el mecanismo de acción de las kisspeptinas en cáncer. El sistema *KISS1/KISS1R* es expresado por las células MCF-7, lo que las convierte en un modelo apropiado para estudiar la regulación del sistema *KISS1/KISS1R* en cáncer de mama.

Por lo descrito previamente y debido a que no se conoce la regulación del sistema *KISS1/KISS1R* en cáncer, es importante estudiar si las kisspeptinas y su receptor son blancos génicos de los estrógenos en el tejido epitelial mamario, ya que todos son factores involucrados en el cáncer de mama. En el presente trabajo, el objetivo fue estudiar si el Estradiol tiene un efecto regulatorio del sistema

KISS1/KISS1R en células de cáncer de mama humano MCF-7, así como evaluar la participación del GPR30 en estos efectos.

A continuación, en la sección de antecedentes, se describen generalidades de los estrógenos y de los receptores nucleares y membranales que median sus acciones. Posteriormente se explica la relación de los estrógenos con el cáncer de mama y los efectos generales de los SERM's. Finalmente se describe al sistema *KISS1/KISS1R* y su relación con el cáncer.

2. Antecedentes

2.1 Estrógenos

Los estrógenos forman parte de la familia de hormonas esteroides. Los esteroides son moléculas derivadas del colesterol, entre los cuales la testosterona es el precursor de los estrógenos. Los estrógenos son formados a través de una reacción que comprende la aromatización del anillo A y que es catalizada por un complejo enzimático llamado P450 aromatasa, el cual utiliza la forma reducida NADPH y oxígeno molecular como cosustratos (Miller y Larionov, 2004). El estrógeno natural más potente en el humano es el 17 β -Estradiol, seguido por la estrona y el estriol. Cada una de estas moléculas es un esteroide de 18 átomos de carbono, que contienen un anillo fenólico A (un anillo aromático con un grupo hidroxilo en el carbono 3) y un grupo hidroxilo en la posición 17 del anillo D. El anillo fenólico A es la principal característica estructural, de la cual depende la unión selectiva y de alta afinidad hacia los RE (Duax *et al.*, 1988). Los estrógenos son producidos principalmente por las gónadas y en menor proporción por las glándulas adrenales (Baquedano *et al.*, 2007), aunque numerosos estudios han reportado su síntesis periférica en tejidos como el adiposo, el muscular (Longcope *et al.*, 1978), la piel (Schweikert *et al.*, 1976) y el óseo (Sasano *et al.*, 1997).

Los estrógenos son fundamentales en el desarrollo y mantenimiento de la función reproductiva de los mamíferos e intervienen en muchos procesos fisiológicos, incluyendo el sistema músculo-esquelético, el inmune, el nervioso central y el cardiovascular, principalmente (Gustafsson, 2003). Las acciones de los estrógenos incluyen efectos protectores contra enfermedades cardiovasculares, la regulación del

metabolismo del colesterol, la protección al hueso y al daño neurológico, así como un rol importante en la morfogénesis de la glándula mamaria (Förster *et al.*, 2002). Los mecanismos de acción mediante los cuales los estrógenos ejercen sus efectos involucran la modulación de la expresión génica mediante mecanismos regulatorios de la transcripción. Las respuestas celulares a los estrógenos son mediadas por receptores que inician una gama compleja de eventos moleculares a partir de la unión del ligando. Estas respuestas pueden ser divididas en dos mecanismos: a) clásicos, que involucran a RE, y se caracterizan por cambios en la regulación génica y ocurren en un plazo de horas o días, y b) no clásicos (iniciados en la membrana celular), que involucran a receptores membranales, y se caracterizan por activar vías de transducción de señales y ocurren en cuestión de segundos, minutos u horas (Björnström and Sjöberg, 2005). A continuación se describen los receptores estrogénicos actualmente conocidos.

2.2 Receptores a estrógenos

La identificación del primer receptor para los estrógenos se realizó en 1973 a partir de extractos de útero de rata, y actualmente se conoce como receptor a estrógenos alfa ($RE\alpha$) (Jensen and De Sombre, 1973). En 1996, se describió un segundo receptor a estrógenos a partir de la próstata de rata, el cual fue denominado receptor a estrógenos beta ($RE\beta$) (Kuiper *et al.*, 1996).

Los RE son parte de la familia de factores de transcripción dependientes de ligando y que reconocen elementos de respuesta a estrógenos (ERE por sus siglas en inglés) que típicamente se localizan en el extremo 5' de los genes de respuesta a estrógenos. A partir de la unión del ligando ocurren cambios conformacionales que llevan a la dimerización del receptor, seguido de la unión al DNA en los sitios próximos al promotor en donde el reclutamiento de coactivadores y correpresores conlleva finalmente a la regulación de la expresión génica (Prossnitz *et al.*, 2008). En cuanto a su distribución, se ha reportado que el $RE\alpha$ se expresa de manera abundante en hipófisis, vagina, útero, epidídimo y testículo, mientras que el $RE\beta$ es abundante en ovario y próstata; la coexpresión de ambos receptores se ha reportado en hipófisis,

hipotálamo, timo, útero y ovario (Kuiper *et al.*, 1997; Dechering *et al.*, 2000). Se ha propuesto que las diferencias funcionales entre el RE α y el RE β , se deban a las diferencias presentes en el dominio de activación transcripcional y en su distribución entre los diferentes tejidos. También se ha sugerido que la existencia de dos RE, los cuales son capaces de heterodimerizarse, podría explicar la gran variedad de efectos biológicos de los estrógenos. Se han realizado estudios en donde se ha reportado que el tipo de proteínas correguladoras que interaccionan con el complejo ligando-dímero, varía según sea el caso de homodímeros del RE α o del RE β , o de heterodímeros RE α -RE β , variando entonces el efecto final (Dechering *et al.*, 2000).

El receptor GPR30 se descubrió en la línea celular de cáncer de mama humano MCF-7 (Carmeci *et al.*, 1997). A finales de la década de 1990, el GPR30 fue clonado como resultado de la elaboración de una biblioteca genómica de GPCR's (O'Dowd *et al.*, 1998). El GPR30 es una proteína de 7 pases transmembranales acoplada a proteínas G. El 17 β -Estradiol presenta una alta afinidad de unión por el GPR30 con una Kd de 3 a 6 nM, en comparación con la unión a otros esteroides como la estrona y el estriol (Revankar *et al.*, 2005; Thomas *et al.*, 2005). En el año 2000 se identificó su función como receptor de membrana a estrógenos, se reportó la activación de las MAPK's, Erk-1 y Erk-2 en respuesta al 17 β -Estradiol y a los antagonistas de RE como el ICI 182,780 y el Tam (Filardo *et al.*, 2000). Posteriormente se describió una fase tardía de la vía de señalización activada por este receptor, en donde se demostró que la activación de adenilato ciclasas, conlleva a un incremento en AMP cíclico que resulta secundariamente en la inactivación de Erk-1 y Erk-2, los cuales son activados al inicio de la vía de señalización del GPR30 (Filardo *et al.*, 2002).

En otro estudio, se demostró la presencia de un sitio de unión específico para el Estradiol en la membrana plasmática de células de cáncer de mama SKBR3 que expresan al GPR30 pero que carecen de RE, así como en células embrionarias de riñón humano 293 (HEK 293) transfectadas con el GPR30 (Thomas *et al.*, 2005).

La localización del GPR30 sigue siendo un tema de debate, ya que en contraste con la evidencia ya descrita que apoya su presencia en la membrana plasmática (Thomas *et al.*, 2005), otros reportes lo ubican en la membrana del retículo endoplásmico y del aparato de Golgi (Revankar *et al.*, 2005, Matsuda *et al.*, 2008).

En un estudio de tamizaje usando células COS7 transfectadas con el GPR30, se identificó un compuesto que se une con alta afinidad al GPR30, el G-1, por lo que se le considera el primer agonista selectivo para el GPR30 (Bologa *et al.*, 2006). Más recientemente, se ha identificado un antagonista para el GPR30, denominado G15, el cual ha evidenciado un papel funcional del GPR30 en el sistema nervioso y reproductivo (Dennis *et al.*, 2009).

Las acciones fisiológicas del GPR30 aún siguen siendo tema de investigación. Sin embargo, se tiene evidencia de su expresión tanto en el sistema nervioso central como en el sistema nervioso periférico. En el cerebro de la rata, tanto del macho como de la hembra se ha demostrado su expresión en el núcleo paraventricular y en el núcleo supraóptico (Brailoiu *et al.*, 2007). En cultivos primarios de neuronas GnRHérgicas de primates, se reportó que el GPR30 media los efectos de los estrógenos sobre las oscilaciones del calcio intracelular de estas neuronas, que son señales excitatorias para la liberación de neurotransmisores (Noel *et al.*, 2009).

En el sistema reproductivo, se ha identificado al GPR30 en células de la granulosa y de la teca del hámster, y que su expresión puede ser regulada por gonadotropinas. Además, en ese mismo estudio se observó que media los efectos estrogénicos para inducir la formación del folículo primordial en el ovario (Wang *et al.*, 2007). En el cáncer, el GPR30 regula la expresión de genes involucrados en la proliferación y sobrevivencia de varias líneas de células tumorales (Maggiolini *et al.*, 2004; Vivacqua *et al.*, 2006; Albanito *et al.*, 2007).

Hasta el momento, el procedimiento que se realiza para diagnosticar si un cáncer de mama es dependiente o no de estrógenos es mediante la evaluación de la expresión de los RE. Sin embargo, en un estudio donde se evaluaron 361 carcinomas de mama invasivos, la expresión del GPR30 se correlacionó positivamente con el tamaño del tumor y con la presencia de metástasis distante (Filardo *et al.*, 2006). Estos datos sugieren que la expresión del GPR30 puede ser un marcador molecular para el pronóstico de la progresión de tumores malignos de mama.

Es bien conocido la existencia de efectos estrogénicos contradictorios, como efectos agonistas y antagonistas sobre determinados tejidos, que ahora podrían explicarse con la existencia del GPR30 que es activado con los fármacos (Tam) que

típicamente se habían utilizado para bloquear los efectos mediados por los RE, de tal forma que el descubrimiento del receptor GPR30 podría contribuir de manera importante a la comprensión de nuevos mecanismos de acción de los estrógenos en condiciones fisiológicas y patológicas.

2.3 Estrógenos y cáncer de mama

El cáncer de mama es el más frecuente y con mayor mortalidad entre las mujeres del mundo. El panorama epidemiológico de esta patología en la población mexicana se transformó en los últimos 50 años y ha pasado a ser un problema de salud pública (Brandan and Villaseñor, 2006).

El cáncer de mama es una enfermedad en la que se desarrollan células malignas en los tejidos de la mama. El tumor aparece cuando una célula acumula mutaciones, generalmente durante varios años, escapando de los procesos que controlan su proliferación y muerte. La glándula mamaria se compone de lóbulos y lobulillos conectados mediante conductos, y esta enfermedad afecta a una, o ambas, de las estructuras mencionadas. Aproximadamente el 80% de los carcinomas son ductales, y el resto, lobulillares.

El riesgo más importante para sufrir cáncer de mama es el sexo del individuo, ya que la relación es de 100 mujeres por cada hombre. La incidencia de esta enfermedad se incrementa con la edad, duplicándose aproximadamente cada 10 años hasta la menopausia, etapa en la cual el ritmo de crecimiento disminuye. En el 46% de las mujeres mexicanas afectadas por el cáncer de mama, éste se presenta antes de los 50 años y el grupo de edad más afectado es el de 40-49 años (Rodríguez-Cuevas *et al.*, 2001).

El cáncer de mama se relaciona con el estado hormonal, y la evidencia disponible indica que el periodo de exposición a estrógenos es un factor crítico de la carcinogénesis de mama. La menarca temprana y menopausia tardía se asocian a periodos prolongados de exposición a estrógenos, y adicionalmente la nuliparidad y los embarazos en edad avanzada aumentan el riesgo de desarrollar cáncer de mama

(McPherson *et al.*, 2000). Contrariamente, se sabe que la preñez y la lactancia son factores protectores contra esta enfermedad (Romieu *et al.*, 1996).

La conexión entre los estrógenos y el cáncer de mama surgió a partir de estudios epidemiológicos que mostraban una mayor incidencia de cáncer en mujeres que se habían sometido a terapias hormonales sustitutivas (Hulka, 1980). Después de 51 estudios epidemiológicos, en 1997, se definió la asociación entre tratamientos hormonales y riesgo de cáncer de mama (Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer, 1997); en tales estudios se observó que el riesgo de cáncer de mama se incrementó 2.3% después de un año del uso de hormonas comparado con el incremento de un 2.8% por año en mujeres con retraso natural del inicio de la menopausia. Sin embargo, el riesgo de cáncer de mama no fue significativo sino hasta después de 5 años de terapia hormonal, lo cual disminuyó dentro de los años siguientes cuando se suspendió el uso hormonal. Actualmente, varios estudios postulan que los procesos tumorigénicos en las glándulas mamarias son frecuentemente modulados por los estrógenos debido a que estimulan el crecimiento del epitelio mamario y de esta manera las células son susceptibles a acumular daños en el DNA aumentando el riesgo de desarrollar un tumor maligno (Pike *et al.*, 1993).

Cuando un tumor es clasificado como dependiente de estrógenos, en el tratamiento se incluyen bloqueadores de la señal estrogénica que generalmente consisten en antagonistas de los RE, de los cuales, el más empleado es el Tam.

Actualmente, la investigación en el campo del cáncer de mama se enfoca a distintos niveles, incluyendo las bases moleculares y celulares de la enfermedad. En ese sentido, un modelo *in vitro* que ha sido ampliamente utilizado para estudiar los mecanismos de acción mediante los cuales los estrógenos ejercen sus efectos sobre las células tumorales, son las células MCF-7. Estas células fueron derivadas de un cultivo primario de células de carcinoma de mama humano obtenidas de la efusión pleural de una paciente con cáncer metastásico avanzado, las células fueron mantenidas en crecimiento durante varias semanas con medio de Eagle suplementado con aminoácidos no esenciales y subcultivadas alrededor de 71 veces (Soule *et al.*, 1973), hasta ser convertidas en una línea celular para el estudio del cáncer de mama. Más tarde, en las mismas células, se caracterizaron los RE, convirtiéndose en la

primera línea celular responsiva a estrógenos (Brooks *et al.*, 1973). En 1997, se caracterizó el receptor GPR30 en estas células, la que las convirtió en un modelo interesante para el estudio de los mecanismos no clásicos (iniciados en la membrana celular) de los estrógenos. Además, se conoce que estas células expresan el gen de las Kisspeptinas, *KISS1*, así como el gen del receptor de las mismas, *KISS1R* (Marot *et al.*, 2007). Por lo descrito previamente, las células MCF-7, son consideradas un buen modelo para el estudio del papel de los estrógenos sobre el epitelio tumoral mamario.

2.4 Moduladores Selectivos de Receptores a Estrógenos (SERM's)

El objetivo primario del tratamiento del cáncer de mama metastásico consiste en paliar los síntomas y controlar el crecimiento tumoral. En las pacientes con cáncer de mama dependiente de estrógenos, el tratamiento de elección es el endocrino, porque tiene eficacia similar a la quimioterapia, pero con mejor tolerancia (Buzdar, 2001). Los tratamientos endocrinos tienen dos blancos principales como parte de su mecanismo de acción: bloquean la producción de estrógenos, que en las mujeres pre-menopáusicas puede ser mediante la ablación ovárica y en las mujeres pos-menopáusicas por medio de la administración de inhibidores de la aromatasa para bloquear la conversión periférica de andrógenos a estrógenos. El segundo mecanismo es el bloqueo de la acción de los estrógenos a nivel de sus receptores nucleares, mediante fármacos antiestrogénicos, como el Tam y otros bloqueadores selectivos (Martínez-Prieto *et al.*, 2009).

Debido al papel de mediadores de los RE en el inicio y desarrollo del cáncer de mama, muchos estudios han enfocado su atención sobre la terapia antiestrogénica utilizando antagonistas farmacológicos de los RE, de tal forma, que incidan sobre el crecimiento y la progresión tumoral. Un aspecto relacionado con dichos estudios es la caracterización funcional de los SERM's, tales como el Tam, que es un antiestrógeno sintético no esteroide, aprobado por la FDA en 1977 y que se prescribe a pacientes con enfermedad temprana y avanzada. La probabilidad de respuesta varía de 60 a 70%, con duración de la misma de 12 a 15 meses (Klijn *et al.*, 2001). La principal desventaja del Tam es que la mayoría de las mujeres que responden de inicio, sufren recurrencia y

resistencia al mismo; además, se asocia con incremento de cáncer endometrial (Vivacqua *et al.*, 2006), lo que sugiere que el Tam puede actuar como un agonista/antagonista tejido-específico. En ese sentido, se ha demostrado que el Tam y el 4-Oht, presentan afinidad de unión por el GPR30, mimetizando la acción de los estrógenos iniciada en la membrana celular (Thomas *et al.*, 2005). En otro estudio reciente, se demostró que el Tam estimuló la proliferación de las células MCF-7, un efecto mediado por el receptor GPR30, lo que sugiere un rol importante de la señalización del GPR30 en el desarrollo de la resistencia al Tam en los pacientes con cáncer de mama (Ignatov *et al.*, 2009).

2.5 El sistema *KISS1/KISS1R* en cáncer

En 1996, buscando genes supresores de metástasis y utilizando una técnica de hibridación sustractiva en células de melanoma maligno, se detectó por primera vez la expresión del gen *KISS1*, al que inicialmente se le llamó metastina; se concluyó que su expresión suprime el potencial metastásico de estas células malignas (Lee *et al.*, 1996).

El gen *KISS1* codifica al precursor de las kisspeptinas, denominado pre-kisspeptinas, que es una proteína de 145 aminoácidos que contiene un péptido señal y una región central de 54 aminoácidos flanqueada por dos sitios de proteólisis, los cuales generan un péptido denominado inicialmente metastina y que actualmente se le conoce como kisspeptina-54 (Kp-54). La Kp-54 sufre cortes proteolíticos para generar otros fragmentos de menor tamaño: 14, 13 y 10 aminoácidos respectivamente (Kp-14, 13 y 10) (Tena-Sempere, 2006). En el ratón y la rata, el fragmento más largo de las kisspeptinas está compuesto de 52 aminoácidos; aunque en general la similitud de secuencia con los productos del gen *KISS1* humano es relativamente baja (~52%), la Kp-10 está altamente conservada entre el humano, el ratón y la rata, donde solamente existe un aminoácido de diferencia en la secuencia (Mead *et al.*, 2007). La Kp-54 es la más abundante en la circulación y alcanza sus niveles más altos en la placenta durante el tercer trimestre del embarazo (Horikoshi *et al.*, 2003).

El receptor KISS1R (inicialmente denominado GPR54) fue identificado en 1999 por Lee y colaboradores como un receptor huérfano. Hasta el año 2001 no había sido descubierto el ligando natural del KISS1R, sin embargo, en ese mismo año algunos grupos de investigación de manera independiente identificaron a la Kp-54 como un potente agonista endógeno de KISS1R (Kotani *et al.*, 2001; Ohtaki *et al.*, 2001). El KISS1R está acoplado a proteínas G de la subfamilia G_{q/11}, y su estimulación resulta en la activación de la fosfolipasa C y en la liberación de calcio de los depósitos intracelulares (Kotani *et al.*, 2001; Neves *et al.*, 2002).

Los niveles de expresión más altos de *KISS1* se han reportado principalmente en la placenta, el páncreas, el hipotálamo y el riñón (Lee *et al.*, 1999; Kotani *et al.*, 2001), mientras, que los de *KISS1R* ocurren en la hipófisis, la placenta, el páncreas, el cerebro y la médula espinal (Kotani *et al.*, 2001, Muir *et al.*, 2001).

Las primeras funciones biológicas asignadas al sistema *KISS1/KISS1R* se enmarcaron en el contexto de la biología del cáncer. Así, desde la clonación inicial del gen *KISS1* (y la caracterización de la metastina) hasta la fecha, un número de publicaciones han propuesto la posible función anti-metastásica de *KISS1* en diversos tumores: melanoma (Shirasaki *et al.*, 2001), de esófago (Ikeguchi *et al.*, 2004), de mama (Kostadima *et al.*, 2007), de ovario (Prentice *et al.*, 2007) y gástrico (Dhar *et al.*, 2004). Sin embargo, en el cáncer hepatocelular (Ikeguchi *et al.*, 2003, Schmid *et al.*, 2007) e incluso en cáncer de mama (Marot *et al.*, 2008) se ha encontrado todo lo contrario, es decir, niveles de expresión altos de *KISS1* y *KISS1R* se correlacionan con mayor progresión del tumor y un pobre diagnóstico en la sobrevivencia de los pacientes. A pesar de todos estos estudios, no se conoce con detalle el mecanismo de acción de las kisspeptinas y su regulación en cáncer.

3. Planteamiento del problema

Debido a que los estrógenos son hormonas importantes en la fisiología del tejido epitelial mamario y en condiciones patológicas están involucrados en el desarrollo de tumores de mama, es de relevancia clínica estudiar si estas hormonas ejercen un efecto regulatorio sobre el sistema *KISS1/KISS1R*, cuyo papel como regulador de la metástasis es respaldado por estudios recientes. Además, en este contexto, es de gran trascendencia analizar si esta acción putativa ocurre a través del receptor membranal GPR30 y si los SERM's tienen algún efecto sobre dicho mecanismo. Para evaluar estas posibilidades, nos propusimos utilizar como modelo de trabajo a la línea celular MCF-7, que es responsiva a los estrógenos y ha sido empleada en una gran cantidad de trabajos como modelo *in vitro* del cáncer de mama.

4. Hipótesis

Los estrógenos modulan la expresión génica del sistema *KISS1/KISS1R* en células MCF-7, a través del receptor membranaral GPR30.

5. Objetivos

5.1 General

Estudiar la modulación estrogénica de los genes *KISS1/KISS1R* en células MCF-7 y la mediación del receptor GPR30.

5.2 Particulares

- Evaluar los efectos del 17 β -Estradiol sobre los niveles del mRNA de *KISS1* y *KISS1R* en las células MCF-7.
- Determinar el efecto de la activación de receptores membranales sobre los niveles de expresión de *KISS1* y *KISS1R* en las células MCF-7 empleando al agonista selectivo del GPR30, el G-1, y al 17 β -Estradiol-BSA.
- Evaluar el efecto de compuestos SERM's sobre los niveles del mRNA de *KISS1* y *KISS1R* en las células MCF-7.

6. Material y métodos

6.1 Cultivo celular

En el presente estudio, se trabajó con las células MCF-7 (RE α +, RE β +, GPR30+) entre los pases 13 y 17. Se cultivaron en placas de 100 mm de diámetro (Greiner Bio-one) con medio de cultivo D-MEM (Gibco) suplementado con 10 % de suero fetal bovino (Gibco) y 10 μ g/ml de penicilina/estreptomicina (Gibco). Los cultivos se mantuvieron dentro de una incubadora a 37°C, en alta humedad y una atmósfera de 5 % de CO₂ en aire. El medio de cultivo se cambió cada tercer día y las células se subcultivaron al llegar a una confluencia del 80 al 90 %. Esto último se realizó mediante una disociación con solución salina balanceada con tripsina al 0.05 % y EDTA-4 Na 0.53 mM (Gibco), seguida de centrifugación a 600 g por 5 min. Inmediatamente después, el sedimento conteniendo las células fue resuspendido en D-MEM y estas fueron sembradas en nuevas placas de cultivo a menor densidad.

Para evitar cualquier efecto debido a esteroides presentes en el suero y al rojo fenol, el medio de cultivo se sustituyó 24 h antes del tratamiento por un medio de cultivo OPTI-MEM reducido en suero y libre de rojo fenol (Gibco).

6.2 Tratamientos

Los tratamientos consistieron en aplicar al 17 β -Estradiol (Sigma), al 17 β -Estradiol-BSA (una modalidad del 17 β -Estradiol impermeable a la membrana plasmática) (Sigma), al agonista selectivo del GPR30, el G-1 (Calbiochem), al Tam (Sigma) y al 4-Oht (Sigma); todos a concentraciones de 1, 10 y 100 nM por 24 h. Para cada grupo tratado y el grupo control se utilizó una n=4. Al final del tratamiento el medio se aspiró y las células se congelaron a -80°C hasta su análisis.

6.3 Extracción de RNA total y transcripción reversa

La extracción del RNA total se llevó a cabo mediante el método de tiocianato de guanidina (Chomczynsky and Sacchi, 1987). El material extraído se sometió a un tratamiento con DNAsas (Ambion) para eliminar la presencia del DNA genómico contaminante, seguido de un último tratamiento con inhibidor de DNAsas para

desactivar a la enzima (Fermentas). Finalmente se cuantificó en un espectrofotómetro (Nanodrop Technologies).

A partir del RNA total, se sintetizó una cadena complementaria de DNA (cDNA) mediante transcripción reversa. La reacción se llevó a cabo mediante una etapa previa de 5 min a 65°C, seguido de un segundo paso de 60 min a 42°C. El volumen de la mezcla de reacción fue de 20 µl conteniendo 2 µg de RNA total, 1 µl de un oligonucleótido iniciador dT 2 µM (Invitrogen), 4 µl de amortiguador 5X (Invitrogen), 2 µl de DTT 50 mM (Invitrogen), 1 µl de dNTP's 20 mM (Invitrogen), 0.5 µl de inhibidor de RNasas 5,000 Unidades (40 U/µl) (Invitrogen) y 1 µl de la enzima transcriptasa reversa 10,000 Unidades (200 U/µl) (Invitrogen).

6.4 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Para verificar la eficiencia de la transcriptasa reversa, se amplificó un fragmento de 173 pb correspondiente al gen de β-actina (un gen de expresión constitutiva) mediante la PCR convencional. Cada reacción se llevó a cabo en un termociclador (Perkin Elmer Geneamp 2400) con un volumen de reacción de 10 µl conteniendo 6.55 µl de agua, 1 µl de una solución amortiguadora 10X, 0.3 µl de MgCl₂ 50 mM, 0.1 µl de dNTP's 20 mM, 1 µl de oligonucleótidos iniciadores 4 µM del gen constitutivo (ver tabla 1), 0.05 µl de taq polimerasa platinum 500 Unidades (5 U/µl) (Invitrogen) y 1 µl de cDNA. Como control negativo se incluyeron reacciones sin molde. Las reacciones se realizaron bajo las siguientes condiciones: una fase de desnaturalización por 2 min a 94°C, seguido de 23 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a la temperatura media de hibridación y 45 s a 72°C para la polimerización. Finalmente una fase de extensión durante 7 min a 72°C. Los productos obtenidos se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio 10 mg/ml (Invitrogen) y comparados con un marcador de peso molecular (Fermentas).

6.5 PCR en tiempo real

La PCR, en la modalidad de tiempo real, es un método muy sensible para la cuantificación de secuencias específicas de ácidos nucleicos. Incluye simultáneamente la amplificación y el análisis de la muestra sin requerir que ésta sea manipulada. Existen

varios métodos de la PCR en tiempo real. El presente trabajo fue realizado usando SYBR[®] Green, una molécula de bajo peso molecular que presenta afinidad por el DNA de doble cadena y al ser oxidado fluoresce. La fluorescencia emitida por el SYBR[®] Green es directamente proporcional al número de copias de DNA de doble cadena obtenido en cada ciclo de la PCR y es monitoreada durante cada ciclo de la reacción. Debido a que en la primera fase del proceso de amplificación de un fragmento de DNA por la PCR, todos los elementos químicos se encuentran en abundancia, la eficiencia de amplificación es muy cercana al 100%. Más importante aún, esta eficiencia de amplificación es constante para las diferentes muestras a analizar. Es en esta etapa en donde la concentración inicial de la muestra es directamente proporcional al número de ciclos requeridos. Por el contrario, en la siguiente fase los oligonucleótidos iniciadores o el cDNA blanco comienzan a ser factores limitantes de la amplificación, por lo que la eficiencia disminuye. Hacia el final de la reacción de la PCR la cantidad de productos obtenidos se mantiene constante sin importar cuantos ciclos más se prolongue la reacción. En esta etapa es frecuente observar que muestras con diferentes concentraciones iniciales tengan el mismo número de copias al final de la reacción. En cierto punto de la reacción los productos de la amplificación acumulados son suficientes para superar la fluorescencia de fondo, lo cual es cuantificado como la máxima de la segunda derivada de la curva y se correlaciona con la cantidad inicial de muestra en la reacción de la PCR, ya que al fijar un nivel de fluorescencia dentro de esta primer fase de la reacción (es decir, si fijamos el número de moléculas finales), entonces el número de ciclos que fueron necesarios para que la fluorescencia alcance este valor fijo, será inversamente proporcional a la concentración inicial de moléculas. Este punto es denominado C_p (por sus siglas en inglés de crossing point). El software del sistema reporta automáticamente los valores de C_p , los cuales se pueden utilizar para llevar a cabo cuantificaciones absolutas o relativas.

El número de copias relativas entre dos muestras (experimental y control) puede ser determinado por la diferencia de sus valores de C_p . Debido a que la PCR es un proceso exponencial, el número de copias relativo es equivalente a la eficiencia de la PCR elevado a la potencia de la diferencia de los valores de C_p de las dos muestras a comparar. Para los cálculos se supone que la eficiencia de la reacción es igual entre

muestras y es del 100 %. Por ser una reacción exponencial, una eficiencia del 100 % duplica la cantidad de productos en cada ciclo de la reacción, por lo que se le atribuye un valor de 2. Por otra parte, debido a que es muy difícil mantener cantidades exactas de DNA en diferentes muestras, los resultados del gen a cuantificar deberán ser normalizados con una referencia, para lo cual se emplea un gen presuntamente invariable. Con base en esto, los cálculos a realizar se efectúan de la siguiente manera: Primero, para normalizar las concentraciones de cDNA se obtiene la diferencia entre los valores de Cp de la muestra y los valores de Cp del gen constitutivo. Al dato obtenido se le nombra ΔCp . Posteriormente se calcula la diferencia entre ΔCp del grupo tratado y el grupo control, obteniendo el dato denominado $\Delta\Delta\text{Cp}$. Posteriormente se obtiene la cantidad relativa elevando 2 al negativo del $\Delta\Delta\text{Cp}$ negativo (ver tabla 2) (Bernard and Wittwer, 2002).

$$\Delta\text{Cp} = \text{Cp}_{\text{muestra}} - \text{Cp}_{\text{gen constitutivo}}$$

$$\Delta\Delta\text{Cp} = \Delta\text{Cp}_{\text{tratado}} - \Delta\text{Cp}_{\text{control}}$$

$$\text{Cantidad relativa} = 2^{-(-\Delta\Delta\text{Cp})}$$

Tabla 2. Cálculos realizados para el análisis de resultados, donde Cp es el ciclo de la reacción que correlaciona la cantidad inicial de muestra. El resultado final es expresado como cantidad relativa de fragmentos de cDNA a cuantificar, lo cual equivale a la expresión relativa del gen de interés.

La evaluación de la expresión de *KISS1* y *KISS1R* se realizó mediante cuantificación relativa, para lo cual se utilizó el LightCycler™ (Corbet Research). Cada mezcla de reacción contuvo 1 μl de cDNA, 0.6 μl del par de oligonucleótidos a una concentración de 2 μM , 6 μl de la mezcla de reacción SYBR® Green Master Mix 2X (Fermentas) y 4.4 μl de agua, teniendo un volumen total de 12 μl . Para normalizar la concentración del cDNA, también se cuantificó la expresión del gen constitutivo de β -actina.

Las condiciones de reacción fueron las siguientes: un ciclo de 30 s a 94° C para activar a la enzima polimerasa mediante la desnaturalización del anticuerpo acoplado a ésta (hot start), después un número de ciclos correspondientes a cada par de oligonucleótidos de interés en los que durante 1 s se somete a 94° C para la desnaturalización del cDNA, seguido de 8 s a la temperatura media de hibridación de cada uno de los oligonucleótidos iniciadores y 10 s a 72° C para el proceso de polimerización. Finalmente, un ciclo de transición de 65° C a 94° C para determinar la especificidad del producto amplificado, el cual, se evaluó mediante una curva de disociación. El software del sistema LightCycler analiza este proceso automáticamente construyendo una gráfica de la detección de fluorescencia en función de la temperatura. Los valores obtenidos se analizaron mediante el método $\Delta\Delta CP$.

Tabla 1. Características de los oligonucleótidos iniciadores diseñados para la PCR
s: sentido, a: antisentido

PRODUCTO DE INTERÉS	SECUENCIA (5´-3´)	TAMAÑO DEL PRODUCTO (pb)
β -Actina	s: CCATCATGAAGTGTGACGTTG a: ACAGAGTACTTGCGCTCAGGA	173
<i>KISS1</i>	s: ACTCACTGGTTTCTTGGCAGC a: ACCTTTTCTAATGGCTCCCCA	70
<i>KISS1R</i>	s: CGACTTCATGTGCAAGTTCGTC a: CCACTCATGGCGGTCAGAG	81

6.6 Estandarización de la PCR en tiempo real

Antes de evaluar la expresión génica, se procedió a estandarizar la técnica de la PCR-tiempo real con la finalidad de establecer las condiciones óptimas de amplificación de cada par de oligonucleótidos utilizados y asegurarnos de que los productos de la reacción fueran los esperados y no artefactos.

Curva de disociación para los oligonucleótidos iniciadores correspondientes a β -actina, KISS1 y KISS1R.

Mediante una curva de disociación, se validó la amplificación específica del gen constitutivo β -actina (173 pb) y de los genes de interés, *KISS1* (70 pb) y *KISS1R* (81pb). Esta curva tiene su fundamento en la temperatura en la que se disocian las cadenas de DNA correspondientes al producto amplificado, ya que es específica para cada fragmento de DNA según su tamaño y secuencia; al registrar la disociación de la doble cadena de DNA en función de la temperatura es posible identificar amplificaciones inespecíficas (artefactos), puesto que al graficarse se observarían varios picos de disociación. Por el contrario, si se trata de un producto único se presentará solamente un pico de disociación.

Como se puede observar en las imágenes A y B de la figura 1, donde se grafica la derivada de la fluorescencia en función de la derivada de la temperatura para cada una de las reacciones de la PCR, la especificidad de los productos amplificados fue la esperada. En cada una de las reacciones se observó una sola temperatura de disociación (un solo pico), indicando así que se generó únicamente un producto de amplificación. Esto se observó en la reacción para β -actina y *KISS1*, es importante mencionar que se corrieron en la misma reacción porque la temperatura media de hibridación fue la misma para cada par de oligonucleótidos (figura 1A). Los controles negativos de RNA sin retrotranscribir y agua no mostraron amplificación. En la reacción para *KISS1R*, también se observó un solo producto de amplificación (figura 1B). Para confirmar lo anterior, se realizó una electroforesis en gel de agarosa con las muestras que presentaron esta señal. Y como se puede observar en la figura 1C, únicamente se encontraron los productos de amplificación esperados: 173 pb (β -actina), 70 pb (*KISS1*) y 81 pb (*KISS1R*), lo cual indica que no hubo amplificaciones inespecíficas. Los controles negativos de RNA y agua, no mostraron amplificación.

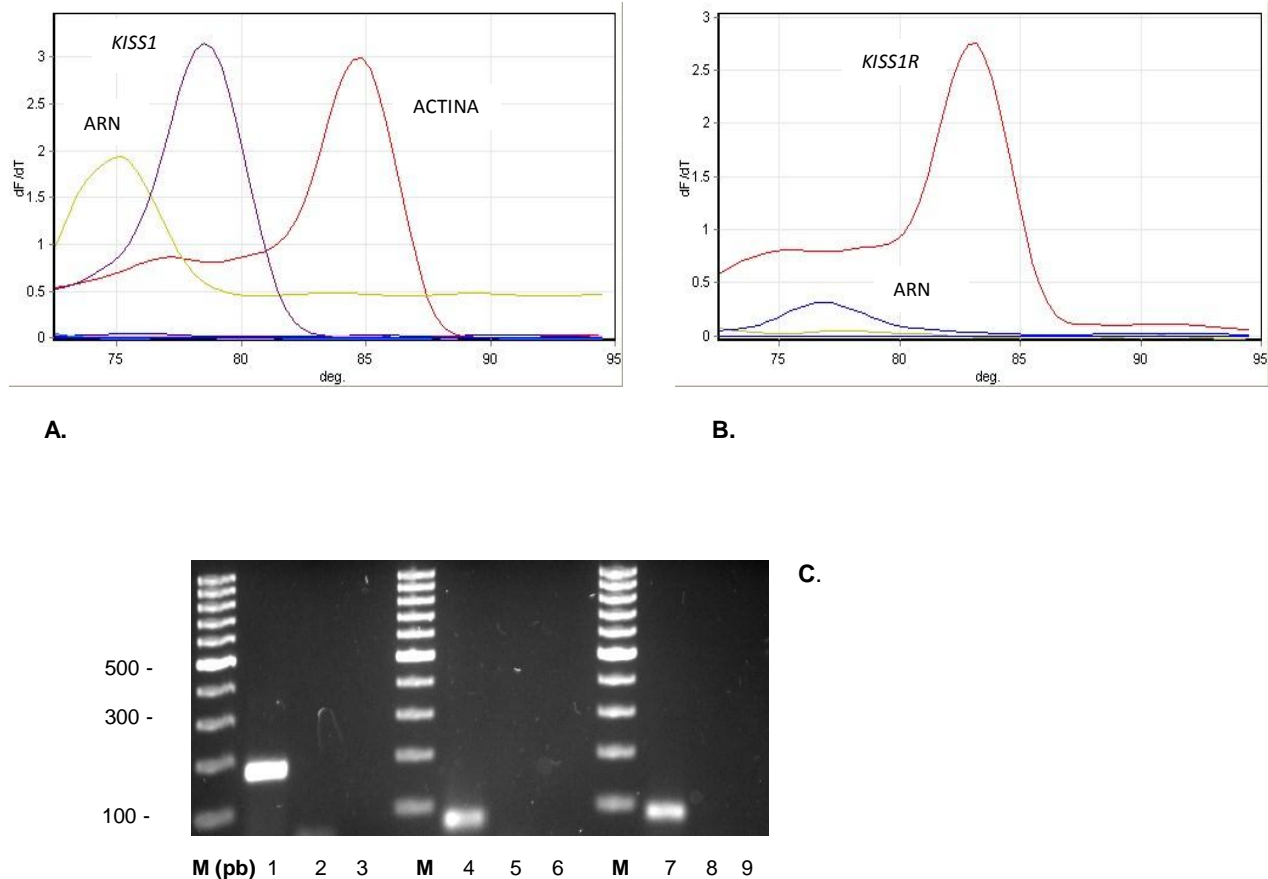


Figura 1. Curva de disociación para β -actina, *KISS1* (A) y *KISS1R* (B), mostrando una única temperatura de disociación específica y comprobado mediante electroforesis en gel de agarosa (C) para los productos de amplificación. Como puede observarse, todas las reacciones presentaron una curva de disociación con un pico único. En todas las reacciones se utilizó cDNA de las células MCF-7 en condiciones basales. M: marcador de peso molecular, carril 1: β -actina, carril 4: *KISS1*, carril 7: *KISS1R*, carriles 2, 3, 5, 6, 8, 9: controles negativos.

6.7 Análisis estadístico

Los resultados se expresan de manera relativa al grupo control, por lo que éste fue normalizado a uno y no presenta varianza entre muestras. Los datos fueron analizados mediante la prueba estadística no paramétrica Kruskal-Wallis One-Way ANOVA. En caso de diferencias significativas se compararon los grupos de pares utilizando el análisis para datos independientes Mann-Whitney U-Test. Los datos con $P < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos.

7. Resultados

A continuación se muestran los resultados obtenidos del análisis de la expresión génica para *KISS1* y *KISS1R* en las células MCF-7 tratadas con el 17 β -Estradiol, 17 β -Estradiol-BSA, G-1, Tam y 4-Oht. Todos los tratamientos mostrados a continuación se aplicaron a 3 concentraciones diferentes: 1, 10 y 100 nM por 24 h.

7.1 Cuantificación de la expresión génica para *KISS1*

En la figura 2 se muestra el efecto de la exposición de células MCF-7 al 17 β -Estradiol por 24 h, sobre la expresión del mRNA de *KISS1*. Observamos que la concentración intermedia (10 nM) del 17 β -Estradiol provocó la disminución estadísticamente significativa de *KISS1* en un 52% con respecto al grupo control. Las otras dos concentraciones no provocaron efectos estadísticamente significativos.

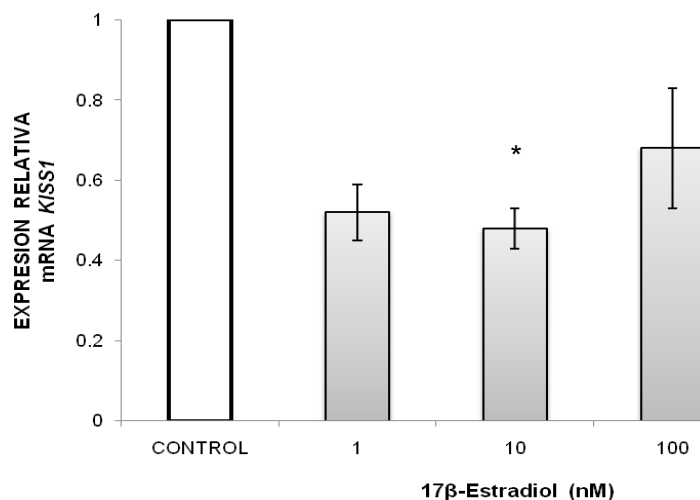


Figura 2. Efecto inhibitorio del 17 β -Estradiol sobre la expresión relativa del mRNA de *KISS1* en células MCF-7. Cada barra representa el promedio \pm SEM de 2 experimentos independientes, con una n=4 en cada uno de ellos. Los datos fueron analizados utilizando el método $\Delta\Delta C_p$ para la determinación de la expresión relativa por la PCR en tiempo real. *(P<0.02), diferencia significativa al compararse con el grupo control.

Para evaluar el efecto de la activación de receptores de membrana a estrógenos sobre la expresión de *KISS1*, se trataron las células MCF-7 con el 17 β -Estradiol-BSA (impermeable a la membrana celular) por 24 h. Como se aprecia en la figura 3, se encontró que todas las concentraciones utilizadas disminuyeron significativamente la expresión de *KISS1* con respecto al grupo control: 1 nM en un 61%, 10 nM en un 60% y 100 nM en un 49%.

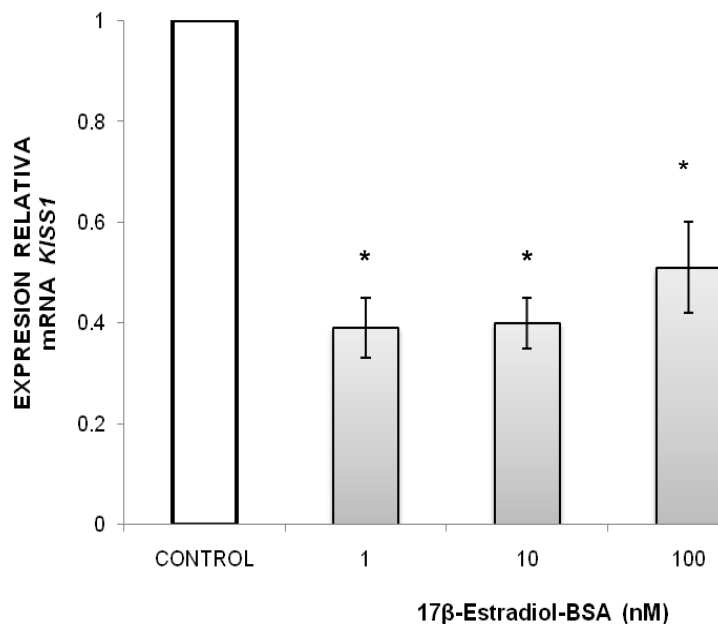


Figura 3. Efecto inhibitorio del 17 β -Estradiol-BSA sobre la expresión relativa del mRNA de *KISS1* en células MCF-7. Cada barra representa el promedio \pm SEM de 2 experimentos independientes con una n=4 en cada uno de ellos. Los datos fueron analizados utilizando el método $\Delta\Delta C_p$ para la determinación de la expresión relativa por la PCR en tiempo real. *(P<0.001), diferencia significativa al compararse con el grupo control.

Para evaluar la participación del receptor membranal GPR30 sobre la expresión de *KISS1*, las células MCF-7 fueron tratadas por 24 h con el agonista selectivo del GPR30, el G-1. Se encontró que la expresión de *KISS1* disminuyó significativamente en un 42% con la concentración de 1 nM, mientras que la de 10 nM provocó una disminución del 36% (figura 4). La disminución no fue estadísticamente significativa en respuesta a la concentración más alta (100 nM) del G-1.

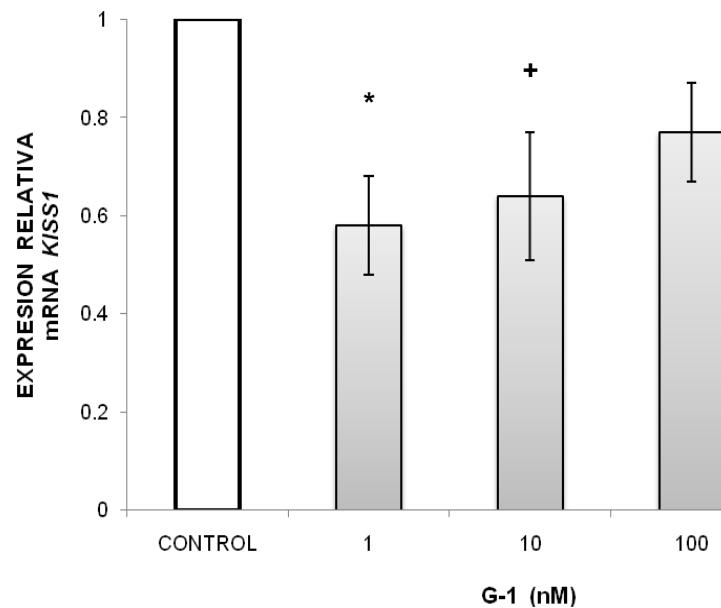


Figura 4. Efecto inhibitorio del G-1 sobre la expresión relativa del mRNA de *KISS1* en células MCF-7. Cada barra representa el promedio \pm SEM de 2 experimentos independientes, con una $n=4$ en cada uno de ellos. Los datos fueron analizados utilizando el método $\Delta\Delta C_p$ para la determinación de la expresión relativa por la PCR en tiempo real. * ($P<0.001$), + ($P<0.01$), diferencia significativa al compararse con el grupo control.

Además de la activación del receptor GPR30 con el G-1, también se probó el efecto agonista de los SERM's sobre el mismo receptor. Para evaluar esta posibilidad, las células MCF-7 fueron tratadas por 24 h con el Tam. Se encontró que la concentración de 1 nM y 100 nM disminuyeron significativamente la expresión de *KISS1* en relación al grupo control en un 30% y 32%, respectivamente. La concentración intermedia de 10 nM no tuvo un efecto significativo.

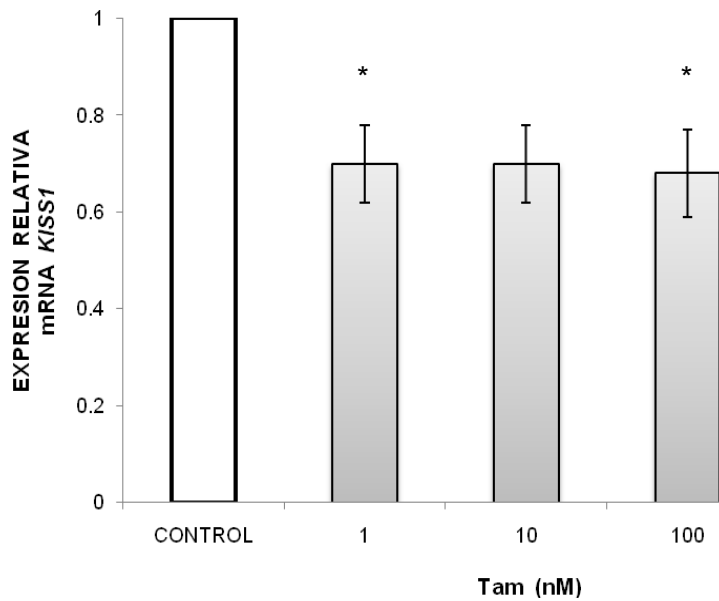


Figura 5. Efecto inhibitorio del Tamoxifeno sobre la expresión relativa del mRNA de *KISS1* en células MCF-7. Cada barra representa el promedio \pm SEM de 2 experimentos independientes, con una $n=4$ en cada uno de ellos. Los datos fueron analizados utilizando el método $\Delta\Delta C_p$ para la determinación de la expresión relativa por la PCR en tiempo real. * ($P<0.01$), diferencia significativa al compararse con el grupo control.

Por su parte, en la figura 6 se observa el efecto de la exposición de las células MCF-7 al 4-Oht por 24 h. Las concentraciones utilizadas no mostraron un efecto significativo sobre la expresión de *KISS1*.

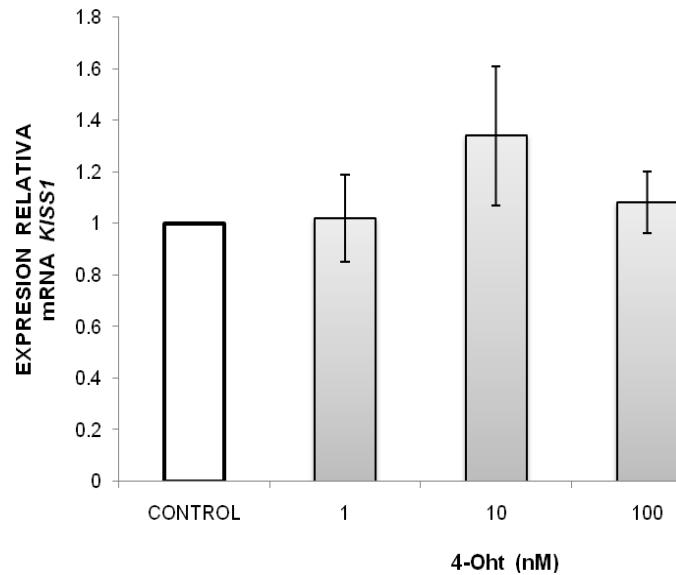


Figura 6. Efecto nulo del 4-Hidroxitamoxifeno sobre la expresión relativa del mRNA de *KISS1* en células MCF-7. Cada barra representa el promedio \pm SEM de 2 experimentos independientes, con una $n=4$ en cada uno de ellos. Los datos fueron analizados utilizando el método $\Delta\Delta C_p$ para la determinación de la expresión relativa por la PCR en tiempo real. Sin diferencia significativa.

7.2 Cuantificación de la expresión génica para *KISS1R*

Los resultados mostrados previamente sugieren que el gen *KISS1* es regulado negativamente por el 17 β -Estradiol, probablemente con la participación del receptor GPR30. Por lo tanto, en el presente trabajo también se evaluó si el gen *KISS1R* es blanco de la regulación estrogénica. Para ello, las células MCF-7 fueron tratadas con el 17 β -Estradiol por 24 h (figura 7). Se encontró que la concentración de 100 nM incrementó significativamente la expresión de *KISS1R* hasta 2 veces en relación al grupo control, mientras que las concentraciones menores no tuvieron un efecto significativo.

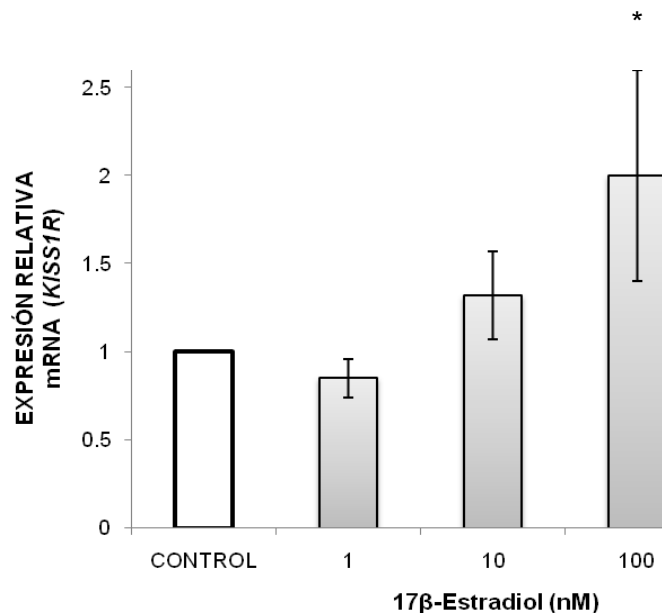


Figura 7. Efecto estimuladorio del 17 β -Estradiol sobre la expresión relativa del mRNA de *KISS1R* en células MCF-7. Cada barra representa el promedio \pm SEM de 2 experimentos independientes, con una n=4 en cada uno de ellos. Los datos fueron analizados utilizando el método $\Delta\Delta C_p$ para la determinación de la expresión relativa por la PCR en tiempo real. * (P<0.01), diferencia significativa al compararse con el grupo control.

Para evaluar si los receptores membranales están implicados en la regulación de *KISS1R*, las células MCF-7 fueron tratadas con el 17 β -Estradiol-BSA por 24 h. Como se aprecia en la figura 8, ninguna de las concentraciones utilizadas afectó significativamente la expresión de *KISS1R*.

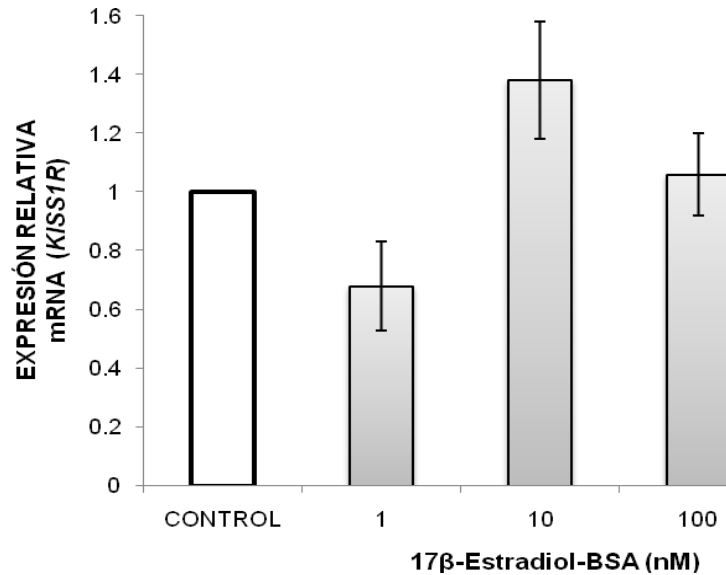


Figura 8. Efecto nulo del 17 β -Estradiol-BSA sobre la expresión relativa del mRNA de *KISS1R* en células MCF-7. Cada barra representa el promedio \pm SEM de 2 experimentos independientes, con una n=4 en cada uno de ellos. Los datos fueron analizados utilizando el método $\Delta\Delta C_p$ para la determinación de la expresión relativa por la PCR en tiempo real. Sin diferencia significativa.

En la figura 9, se aprecia el efecto de la activación del receptor GPR30 en las células tratadas con el G-1 durante 24 h. Ninguna de las concentraciones utilizadas presentó un efecto significativo sobre la expresión de *KISS1R*.

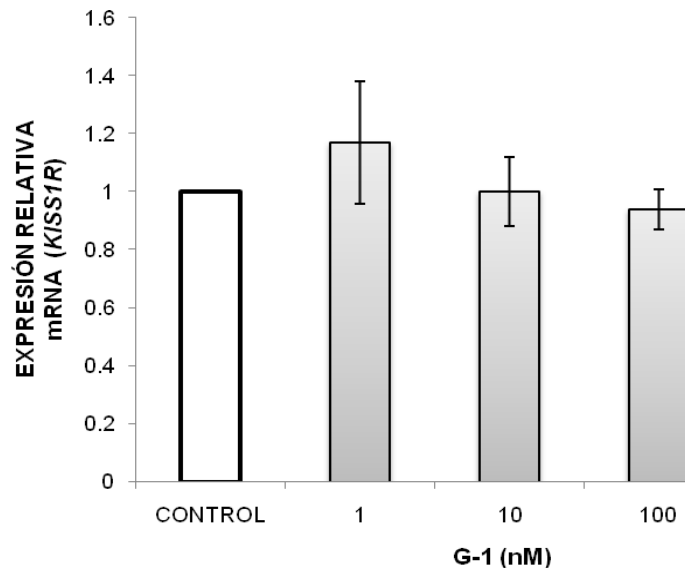


Figura 9. Efecto nulo del G-1 sobre la expresión relativa del mRNA de *KISS1R* en células MCF-7. Cada barra representa el promedio \pm SEM de 2 experimentos independientes, con una $n=4$ en cada uno de ellos. Los datos fueron analizados utilizando el método $\Delta\Delta C_p$ para la determinación de la expresión relativa por la PCR en tiempo real. Sin diferencia significativa.

También se evaluó el efecto de los SERM's sobre la expresión de *KISS1R* al actuar como agonistas del GPR30, para lo cual, las células MCF-7 fueron tratadas con el Tam por 24 h. Como se aprecia en la figura 10, las concentraciones utilizadas no tuvieron un efecto significativo sobre la expresión de *KISS1R*.

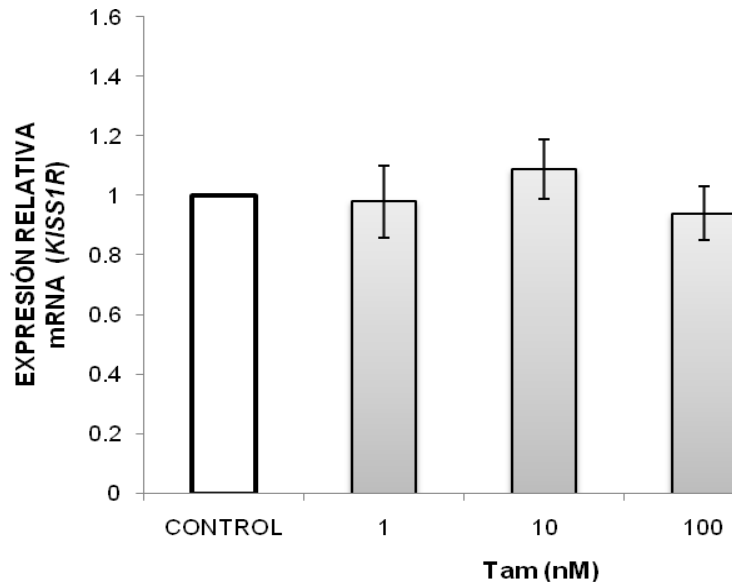


Figura 10. Efecto nulo del Tamoxifeno sobre la expresión relativa del mRNA de *KISS1R* en células MCF-7. Cada barra representa el promedio \pm SEM de 2 experimentos independientes, con una $n=4$ en cada uno de ellos. Los datos fueron analizados utilizando el método $\Delta\Delta C_p$ para la determinación de la expresión relativa por la PCR en tiempo real. Sin diferencia significativa.

Finalmente, las células MCF-7 expuestas al 4-Oht durante 24 h, presentaron una disminución significativa en la expresión de *KISS1R* en un 31% con la concentración de 1 nM en relación al grupo control. Las dos concentraciones mayores no tuvieron un efecto significativo (figura 11).

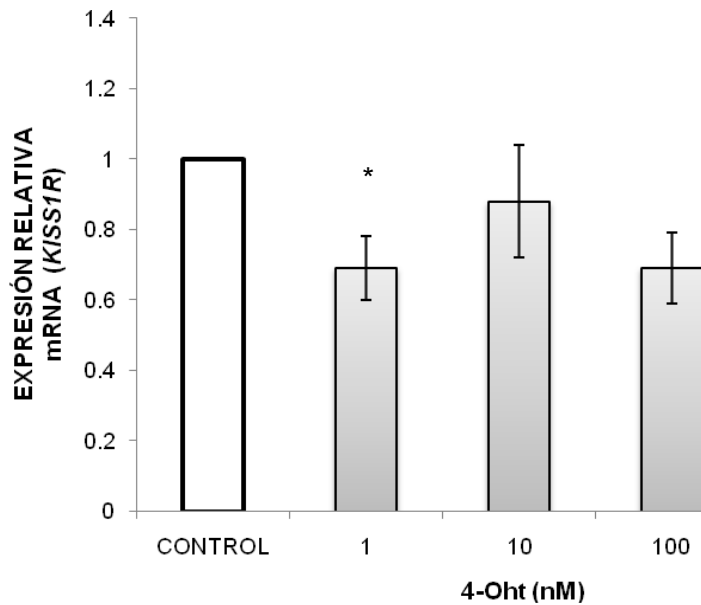


Figura 11. Efecto inhibitorio del 4-Hidroxitamoxifeno sobre la expresión relativa del mRNA de *KISS1R* en células MCF-7. Cada barra representa el promedio \pm SEM de 2 experimentos independientes, con una $n=4$ en cada uno de ellos. Los datos fueron analizados utilizando el método $\Delta\Delta C_p$ para la determinación de la expresión relativa por la PCR en tiempo real. * ($P<0.001$), diferencia significativa al compararse con el grupo control.

8. Discusión

Es bien conocido que las hormonas esteroides, particularmente los estrógenos, presentan una amplia gama de efectos sobre múltiples tejidos blanco en prácticamente todo el organismo. Entre ellos, destaca su papel fundamental en el desarrollo normal y neoplásico de la glándula mamaria, de tal manera que son considerados como uno de los factores de riesgo más importantes en la carcinogénesis de mama. Los mecanismos mediante los cuales estas hormonas llevan a cabo su acción involucran la activación de receptores tanto nucleares como membranales, los cuales influyen sobre la maquinaria transcripcional para regular la expresión de genes relacionados con diversas funciones celulares como la proliferación. Sin embargo, en condiciones patológicas como en el cáncer de mama, no se tiene del todo claro los tipos de receptores que median los efectos estrogénicos, así como los genes blancos regulados en dicha condición.

El uso de líneas celulares como modelo *in vitro* para el estudio del cáncer de mama ha facilitado el avance en la comprensión de los mecanismos celulares y moleculares que subyacen a esta patología. Las células MCF-7 han sido exhaustiva y exitosamente usadas como modelo de tumor mamario para estudiar los efectos de los estrógenos en tales condiciones. En el presente trabajo propusimos como hipótesis que la modulación estrogénica de las células MCF-7, incluye al sistema *KISS1/KISS1R* como blanco génico, el cual, juega un rol importante para inhibir la metástasis. En el contexto reproductivo, varios estudios postulan que en el núcleo periventricular antero-ventral del hipotálamo de roedores, *KISS1* es regulado positivamente por el 17 β -Estradiol, mientras que en el núcleo arcuato lo regula negativamente (Smith *et al.*, 2005). El resultado final de esta regulación es la activación del eje hipotálamo-hipófisis-gónada y consecuentemente la función reproductiva. Sin embargo, no se ha explorado por completo si en el cáncer de mama ocurre una regulación similar, así como los receptores estrogénicos que mediarían dichas acciones. Para analizar esta posibilidad, utilizamos a las células MCF-7 responsivas a estrógenos (RE α +, RE β +, GPR30+), en donde se determinó el efecto del 17 β -Estradiol, del 17 β -Estradiol-BSA, del G-1, del Tam y del 4-Oht, sobre los niveles de expresión del sistema *KISS1/KISS1R*.

El Tam y el 4-Oht son SERM's, es decir, son antagonistas parciales de los RE. En años recientes se demostró que los SERM's pueden mimetizar las acciones de los estrógenos iniciadas en la membrana celular, al actuar como agonistas parciales del receptor membranal GPR30 (Filardo *et al.*, 2000), lo que supone un funcionamiento más complejo de los SERM's de lo que originalmente se pensaba.

Nuestros resultados, proporcionan evidencia experimental de que el gen de las kisspeptinas, *KISS1*, es modulado negativamente por la acción de los estrógenos, mientras que el gen de su receptor, *KISS1R*, es modulado parcialmente de forma positiva. La primera evidencia en la disminución de *KISS1* se observó con el 17 β -Estradiol, quien lo disminuyó en un 52% después de 24 h del tratamiento. Cuando las células fueron tratadas con el 17 β -Estradiol-BSA, un compuesto que solo activa a receptores membranales a estrógenos por ser impermeable a la membrana celular, encontramos que también disminuyó significativamente la expresión de *KISS1* hasta un 61%. Este último resultado sugiere que no es necesario que el 17 β -Estradiol entre a la célula para disminuir la expresión de *KISS1* y propone que la activación de receptores membranales es suficiente para afectar negativamente la expresión de *KISS1*. Estos resultados coinciden con un reporte previo realizado en las células MDA-MB231 transfectadas con los RE α y β , donde se encontró que la concentración de 100 nM del 17 β -Estradiol disminuyó significativamente el nivel de expresión de *KISS1* después de 24 h (Marot *et al.*, 2007); sin embargo, en ese estudio no se evaluó la participación de receptores membranales a estrógenos como el GPR30. En otro estudio, la proteína AP-2 α , se demostró que es un regulador transcripcional positivo de *KISS1* en líneas celulares de cáncer de mama mediante su interacción con la proteína SP1 (Mitchell *et al.*, 2006). En neuronas hipotalámicas de ratón GT1-7, se demostró que los estrógenos regulan la expresión de *KISS1* a través de un complejo formado por el RE α y las proteínas SP1/SP3 (Li *et al.*, 2007). En otro trabajo realizado en ratas, se demostró que el agonista selectivo del RE β , no previno el incremento hipotalámico del mRNA de *KISS1* después de la ovariectomía (Navarro *et al.*, 2004), sugiriendo que el RE β no participa en la regulación negativa de *KISS1* en el hipotálamo.

Un efecto similar producido por el 17β -Estradiol-BSA se observó al aplicar el agonista selectivo del GPR30, el G-1; se encontró que afectó la expresión de *KISS1* al disminuirlo significativamente hasta un 41%, sugiriendo que la activación del GPR30 forma parte del mecanismo que regula negativamente a *KISS1* en las células MCF-7. En otro estudio, se demostró que el G-1 incrementó la proliferación de células tumorales mediante su unión específica al GPR30, evidenciando la funcionalidad del receptor en la proliferación tumoral (Albanito *et al.*, 2007). En ese sentido, se ha propuesto al GPR30 como un marcador molecular de diagnóstico negativo durante la progresión de tumores mamarios (Filardo *et al.*, 2006, Filardo *et al.*, 2008).

Actualmente, se sigue estudiando el papel funcional del GPR30 en cáncer, sin embargo, hasta el momento no hay reportes que demuestren la relación del GPR30 con la expresión del gen supresor de metástasis *KISS1*. Por lo tanto, el presente trabajo es la primera evidencia de la participación putativa del GPR30 en la regulación negativa de los estrógenos sobre *KISS1* en células de cáncer mamario, involucrando un mecanismo no clásico, es decir, un mecanismo independiente de los RE. Además, se demuestra una regulación estrogénica de *KISS1* similar a la que sucede en el núcleo arcuato del hipotálamo, pero utilizando un modelo de células de cáncer de mama. Estos resultados apoyan la idea de que las acciones de los estrógenos son dependientes de la distribución de sus receptores para afectar la fisiología de un tejido específico.

Por su parte, los SERM's presentaron un efecto parcial sobre los niveles de expresión de *KISS1*. El Tam lo disminuyó significativamente hasta un 32% después de 24 h de tratamiento, mientras que el 4-Oht no presentó un efecto significativo. A diferencia de las concentraciones utilizadas en el presente trabajo, Marot y colaboradores (2007), encontraron que 1 μ M del Tam incrementó la expresión de *KISS1* en las células MCF-7 después de 24 h de tratamiento. Estos resultados diferentes podrían deberse a la diferencia de concentraciones utilizadas en cada estudio. En el nuestro, encontramos que 1 nM del Tam fue suficiente para disminuir un 30% la expresión de *KISS1*, mientras que 100 nM lo disminuyó un 32%. De acuerdo a lo anterior, es posible que el Tam a concentraciones altas tenga un efecto positivo sobre *KISS1*, mientras que a concentraciones bajas, tenga un efecto negativo sobre su expresión. Se necesitarán de más estudios para evaluar esta posibilidad. De

confirmarse totalmente que el Tam actúa como un agonista del GPR30, nuestros resultados sugieren un efecto novedoso del Tam al conocido y que pudiera impactar en la terapia antiestrogénica del cáncer de mama con resultados negativos; ya que estaría disminuyendo la expresión de un gen supresor de metástasis (*KISS1*), además, al activar al GPR30 estaría promoviendo la proliferación de las células tumorales. En el caso del 4-Oht, se ha demostrado que presenta mayor afinidad por el GPR30; sin embargo, en nuestras condiciones experimentales, este compuesto no presentó un efecto significativo sobre *KISS1* en las células MCF-7. Se necesitarán de más estudios para evaluar la acción agonista del 4-Oht sobre el GPR30 y de sus efectos en las células MCF-7.

Por otro lado, se ha reportado que las acciones de las kisspeptinas son mediadas por su receptor *KISS1R*, cuyo papel se ha investigado en el campo reproductivo y parcialmente en el cáncer. Sin embargo, se desconoce su regulación génica en cáncer de mama. Por lo tanto, en el presente trabajo, también se investigó si los estrógenos modulan a este receptor. Encontramos que a las 24 h de tratamiento con el 17 β -Estradiol, se presentó un incremento significativo en la expresión de *KISS1R* de hasta 2 veces. El 17 β -Estradiol-BSA y el G-1 no tuvieron efectos significativos sobre la expresión de *KISS1R*. Estos resultados sugieren que el incremento en los niveles del mRNA de *KISS1R* en las células MCF-7 requiere de la entrada del 17 β -Estradiol a la célula y de la activación de los RE, a diferencia de lo encontrado para *KISS1*. El Tam no presentó ningún efecto sobre *KISS1R*. En el estudio previo realizado por Marot y colaboradores (2007), encontraron que 1 μ M del Tam incrementó la expresión de *KISS1R* en las células MCF-7. Estos resultados diferentes, podrían deberse a las diferentes concentraciones utilizadas. En nuestro estudio, la concentración más alta fue de 100 nM, sin embargo, no se observó ningún efecto significativo sobre *KISS1R*. Por su parte, el 4-Oht, disminuyó significativamente la expresión de *KISS1R* en un 31%. Este último resultado ha sido difícil de explicar, aunque es probable que el 4-Oht esté actuando como agonista de algún tipo de receptor, que puede ser nuclear o membranal (GPR30).

Es importante considerar que en el presente estudio únicamente se determinó la expresión génica de las kisspeptinas y de su receptor a nivel de RNA mensajero, lo cual

es un indicio de un posible efecto a nivel de la síntesis proteica, que hasta no ser evaluado directamente no es posible afirmar. De ser proporcional la disminución en la expresión de *KISS1* con la disminución en la expresión proteica, el resultado final tendría implicaciones sobre la capacidad de las células tumorales para originar nuevas metástasis en el cáncer de mama. Estos hallazgos son prometedores por sus implicaciones clínicas que pudieran tener para correlacionar los niveles de expresión de receptores estrogénicos (entre los que destacaría el GPR30) y niveles de expresión de *KISS1/KISS1R*, con la finalidad de realizar un diagnóstico de la progresión de tumores de mama.

9. Conclusión

Nuestros hallazgos, sugieren que en las células MCF-7 de cáncer de mama humano, el gen supresor de metástasis *KISS1* es modulado negativamente por los estrógenos, involucrando la participación putativa del receptor membranal GPR30; mientras que al gen *KISS1R* es modulado de forma positiva también por los estrógenos, acción en la que no participan los receptores membranales. Estos descubrimientos podrían tener implicaciones sobre la progresión del cáncer de mama y formación de metástasis. En este contexto, se demuestra la participación del receptor de membrana GPR30 en las acciones de los estrógenos en células de cáncer de mama.

10. Referencias

Albanito L, Madeo A, Lappano R, Vivacqua A, Rago V, Carpino A, Oprea IT, Prossnitz RE, Musti AM, Andó S and Maggioloni M (2007). G protein-coupled receptor 30 (GPR30) mediates gene expression changes and growth response to 17 β -estradiol and selective GPR30 ligand G-1 in ovarian cancer cells. *Cancer Res* 67(4): 1859-1866.

Bernard PS, Wittwer CT (2002). Real-time PCR technology for cancer diagnostics. *Clin Chem* 48(8):1178-1185.

Baquedano MS, Saraco N, Berensztein E, Pepe C, Bianchini M, Levy E, Goñi J, Rivarola MA and Belgorosky A (2007). Identification and developmental changes of aromatase and estrogen receptor expression in prepubertal and pubertal human adrenal tissues. *J Clin Endocrinol Metab* 92(6): 2215–2222.

Björnström L, Sjöberg M (2002). Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes. *J Clin Endocrinol Metab* 19(4): 833-842.

Bologa CG, Revankar CM, Young SM, Edwards BS, Arterburn JB, Kiselyov AS, Parker MA, Tkachenko SE, Savchuck NP, Sklar LA, Oprea TI, Prossnitz ER (2006). Virtual and biomolecular screening converge on a selective agonist for GPR30. *Nat Chem Biol* 2(4): 207–212.

Brailoiu E, Dun SL, Brailoiu GC, Mizuo K, Sklar LA, Oprea TI, Prossnitz ER, Dun NJ (2007). Distribution and characterization of estrogen receptor G protein-coupled receptor 30 in the rat central nervous system. *J Endocrinol* 193(2): 311-321.

Brandan ME, Villaseñor NY (2006). Cáncer de Mama: Estado de la Mamografía en México. *Cancerología* 1(3): 147-162.

Brooks SC, Locke ER, Soule HD (1973). Estrogen receptor in a human cell line (MCF-7) from breast carcinoma. *J Biol Chem* 248(17): 6251-6253.

Buzdar AU (2001). Endocrine therapy in the treatment of metastatic breast cancer. *Semin Oncol* 28(3): 291-304.

Carmeci C, Thompson DA, Ring HZ, Francke U, Weigel RJ (1997). Identification of a gene (GPR30) with homology to the G-protein-coupled receptor superfamily associated with estrogen receptor expression in breast cancer. *Genomics* 45(3): 607-617.

Chomczynski P, Sacchi N (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162(1): 156-159.

Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer (1997). Breast cancer and hormone replacement therapy: collaborative reanalysis of data from 51 epidemiological studies of 52 705 women with breast cancer and 108 411 women without breast cancer. *Lancet* 350(9084): 1047–1059.

Dechering K, Boersma C, Mosselman S (2000). Estrogen receptors alpha and beta: two receptors of a kind? *Curr Med Chem* 7(5): 561-576.

Dennis, MK, Burai R, Ramesh C, Petrie WK, Alcon SN, Nayak T, Bologna C, Leitao A, Brailoiu E, Deliu E, Dun NJ, Sklar LA, Hathaway HJ, Arterburn JB, Oprea TO and Prossnitz, ER (2009). In vivo effects of a GPR30 antagonist. *Nat Chem Biol* 5(6): 421-427.

Dhar DK, Naora H, Kubota H, Maruyama R, Yoshimura H, Tonomoto Y, Tachibana M, Ono T, Otani H, Nagasue N (2004). Downregulation of KiSS-1 expression is responsible for tumor invasion and worse prognosis in gastric carcinoma. *Int J Cancer* 111(6): 868-872.

Duax WL, Griffin JF, Weeks CM and Wawrzak Z (1988). The mechanism of action of steroid antagonists: insights from crystallographic studies. *J Steroid Biochem* 31(4B): 481-492.

Filardo EJ, Quinn JA, Bland KI, Frackelton AR Jr. (2000). Estrogen-induced activation of Erk-1 and Erk-2 requires the G protein-coupled receptor homolog, GPR30, and occurs via trans-activation of the epidermal growth factor receptor through release of HB-EGF. *Mol Endocrinol* 14(10): 1649-1660.

Filardo EJ, Quinn JA, Frackelton AR Jr, Bland KI (2002). Estrogen action via the G protein-coupled receptor, GPR30: stimulation of adenylyl cyclase and cAMP-mediated attenuation of the epidermal growth factor receptor-to-MAPK signaling axis. *Mol Endocrinol* 16(1): 70-84.

Filardo EJ, Graeber CT, Quinn JA, Resnick MB, Giri D, DeLellis RA, Steinhoff MM and Sabo E (2006). Distribution of GPR30, a seven membrane-spanning estrogen receptor, in primary breast cancer and its association with clinicopathologic determinants of tumor progression. *Clin Cancer Res* 12(21): 6359-6366.

Filardo EJ, Quinn JA, Sabo E (2008). Association of the membrane estrogen receptor, GPR30, with breast tumor metastasis and transactivation of the epidermal growth factor receptor. *Steroids* 73(9-10):870-873.

Förster C, Mäkela S, Wärrri A, Kietz S, Becker D, Hultenby K, Warner M, Gustafsson JA (2002). Involvement of estrogen receptor beta in terminal differentiation of mammary gland epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(24): 15578-15583.

Gustafsson JA (2003). What pharmacologists can learn from recent advances in estrogen signalling. *Trends Pharmacol Sci* 24(9): 479–485.

Henderson BE, Ross R, Bernstein L (1988). Estrogens as a cause of human cancer: The Richard and Hinda Rosenthal Foundation Award Lecture. *Cancer Res* 48(2): 246-253.

Horikoshi Y, Matsumoto H, Takatsu Y, Ohtaki T, Kitada C, Usuki S, Fujino M (2003). Dramatic elevation of plasma metastin concentrations in human pregnancy: metastin as a novel placenta-derived hormone in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 88(2): 914-919.

Hulka BS (1980). Effect of exogenous estrogen on postmenopausal women: the epidemiologic evidence. *Obstet Gynecol Surv* 35(6): 389-399.

Ignatov A, Ignatov T, Roessner A, Costa SD, Kalinski T (2009). Role of GPR30 in the mechanisms of tamoxifen resistance in breast cancer MCF-7 cells. *Breast Cancer Res Treat* 123(1): 87-96.

Ikeguchi M, Hirooka Y, Kaibara N (2003). Quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction analysis for KiSS-1 and orphan G-protein-coupled receptor (hOT7T175) gene expression in hepatocellular carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 129(9): 531-535.

Ikeguchi M, Yamaguchi K, Kaibara N (2004). Clinical significance of the loss of KiSS-1 and orphan G-protein-coupled receptor (hOT7T175) gene expression in esophageal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 10(4): 1379-1383.

Jensen EV and DeSombre ER (1973). Estrogen-receptor interaction. *Science* 182(108): 126–134.

Klijn JG, Blamey RW, Boccardo F, Tominaga T, Duchateau L, Sylvester R; Combined Hormone Agents Trialists' Group and the European Organization for Research and Treatment of Cancer (2001). Combined tamoxifen and luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) agonist versus LHRH agonist alone in premenopausal advanced breast cancer. A meta-analysis of four randomized trials. *J Clin Oncol* 19(2): 343-353.

Kostadima L, Pentheroudakis G, Pavlidis N (2007). The missing kiss of life: transcriptional activity of the metastasis suppressor gene KiSS1 in early breast cancer. *Anticancer Res* 27(4B): 2499-2504.

Kotani M, Detheux M, Vandenbogaerde A, Communi D, Vanderwinden JM, Le Poul E, Brezillon S, Tyldesley R, Suarez-Huerta N, Vandeput F, Blanpain C, Schiffmann SN, Vassart G and Parmentier M (2001). The metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor GPR54. *J Biol Chem* 276(37): 34631–34636.

Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S and Gustafsson JA (1996). Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci USA* 93(12): 5925-5930.

Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Haggblad J, Nilsson S, Gustafsson JA (1997). Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* 138(3): 863-870.

Li D, Mitchell D, Luo J, Yi Z, Cho SG, Guo J, Li X, Ning G, Wu X, Liu M (2007). Estrogen regulates KiSS1 gene expression through estrogen receptor alpha and SP protein complexes. *Endocrinology* 148(10):4821-4828.

Lee DK, Nguyen T, O'Neill GP, Cheng R, Liu Y, Howard AD, Coulombe N, Tan CP, Tang-Nguyen AT, George SR and O'Dowd BF (1999). Discovery of a receptor related to the galanin receptors. *FEBS Lett* 446(1): 103-107.

Lee JH, Miele ME, Hicks DH, Phillips KK, Trent JM, Weissman BE and Welch DR (1996). KiSS-1, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene. *J Natl Cancer Inst* 88(23): 1731-1737.

Longcope C, Pratt JH, Schneider SN, Fineberg SE (1978). Aromatization of androgens by muscle and adipose tissue in vivo. *J Clin Endocrinol Metab* 46(1): 146–152.

Navenot JM, Fujii N, Peiper SC (2009). KiSS1 metastasis suppressor gene product induces suppression of tyrosine kinase receptor signaling to Akt, tumor necrosis factor family ligand expression, and apoptosis. *Mol Pharmacol* 75(5): 1074-1083.

Neves SR, Ram PT and Iyengar R (2002). G protein pathways. *Science* 296(5573): 1636–1639.

Noel SD, Keen KL, Baumann DI, Filardo EJ and Terasawa E (2009). Involvement of g-protein coupled receptor 30 (GPR30) in rapid action of estrogen in primate LHRH neurons. *Mol Endocrinol* 23(3): 349-359.

Maggiolini M, Vivacqua A, Fasanella G, Recchia AG, Sisci D, Pezzi V, Montanaro D, Musti AM, Picard D and Andò S (2004). The G protein coupled receptor GPR30 mediates c-fos up-regulation by 17 β -estradiol and phytoestrogens in breast cancer cells. *J Biol Chem* 279(26): 27008–27016.

Marot D, Bieche I, Aumas C, Esselin S, Bouquet C, Vacher S, Lazennec G, Perricaudet M, Kuttenn F, Lidereau R, de Roux N (2007). High tumoral levels of Kiss1 and G-protein-coupled receptor 54 expression are correlated with poor prognosis of estrogen receptor-positive breast tumors. *Endocr Relat Cancer* 14(3): 691-702.

Martínez-Prieto M, Flores de la Torre CB, Rivera RS, Esquivel CI (2009). Hormonoterapia en cáncer de mama metastásico. *Ginecol Obstet Mex* 77(10): 482-486.

Matsuda K, Sakamoto H and Hosokawa K (2008). Expression and intracellular distribution of the G protein-coupled estrogen receptor, GPR30, in rat hippocampus. *Neurosci Lett* 441(1): 94–99.

McPherson K, Steel CM and Dixon JM (2000). ABC of breast diseases. Breast cancer-epidemiology, risk factors and genetics. *Br Med J* 321(7261): 624-628.

Mead EJ, Maguire JJ, Kuc RE, Davenport AP (2007). Kisspeptins: a multifunctional peptide system with a role in reproduction, cancer and the cardiovascular system. *Br J Pharmacol* 151(8): 1143-53.

Miller WR, Larionov A (2004). Aromatase 2004, Edinburgh, UK, 6-8 September 2004. *Breast Cancer Res* 7(1): E2.

Mitchell DC, Abdelrahim M, Weng J, Stafford LJ, Safe S, Bar-Eli M, Liu M (2006). Regulation of KiSS-1 metastasis suppressor gene expression in breast cancer cells by

direct interaction of transcription factors activator protein-2alpha and specificity protein-1. *J Biol Chem* 281(1): 51-58.

Muir AI, Chamberlain L, Elshourbagy NA, Michalovich D, Moore DJ, Calamari A, Szekeres PG, Sarau HM, Chambers JK, Murdock P, Steplewski K, Shabon U, Miller JE, Middleton SE, Darker JG, Larminie CG, Wilson S, Bergsma DJ, Emson P, Faull R, Philpott KL, Harrison DC (2001). AXOR12, a novel human G protein-coupled receptor, activated by the peptide KiSS-1. *J Biol Chem* 276(31): 28969-28975.

O'Dowd BF, Nguyen T, Marchese A, Cheng R, Lynch KR, Heng HH, Kolakowski LF Jr and George SR (1998). Discovery of three novel G-protein-coupled receptor genes. *Genomics* 47(2): 310-313.

Ohtaki T, Shintani Y, Honda S, Matsumoto H, Hori A, Kanehashi K, Torao Y, Kumano S, Takatsu Y, Matsuda Y, Ishibashi Y, Watanabe T, Asada M, Yamada T, Suenaga M, Kitada C, Usuki S, Kurokawa T, Onda H, Nishimura O and Fujino M (2001). Metastasis suppressor gene KiSS1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor. *Nature* 411(6837) :613–617.

Otto C, Rohde-Schulz B, Schwarz G, Fuchs I, Klewer M, Brittain D, Langer G, Bader B, Prella K, Nubbemeyer R, and Karl-Heinrich F (2008). G protein-coupled receptor 30 localizes to the endoplasmic reticulum and is not activated by estradiol. *Endocrinology* 149(10): 4846–4856.

Otto C, Fuchs I, Kauselmann G, Heidrun K ,Zevnik B, Andreasen P, Schwarz G, Altmann H, Klewer M, Schoor M, Vonk and Karl-Heinrich F (2009). GPR30 does not mediate estrogenic responses in reproductive organs in mice. *Biol of Reprod* 80(1): 34–41.

Pike MC, Spicer DV, Dahmouch L and Press MF (1993). Estrogens, progestogens, normal breast cell proliferation and breast cancer risk. *Epidemiol Rev* 15(1): 17–35.

Prentice LM, Klausen C, Kalloger S, Köbel M, McKinney S, Santos JL, Kenney C, Mehl E, Gilks CB, Leung P, Swenerton K, Huntsman DG, Aparicio SA (2007). Kisspeptin and GPR54 immunoreactivity in a cohort of 518 patients defines favourable prognosis and clear cell subtype in ovarian carcinoma. *BMC Med* 5: 33.

Prossnitz ER, Arterburn JB, Smith HO, Oprea TI, Sklar LA and Hathaway HJ (2008). Estrogen signaling through the transmembrane G protein-coupled receptor GPR30. *Annu Rev Physiol* 70: 165-190.

Revankar CM, Cimino DF, Sklar LA, Arterburn JB and Prossnitz ER (2005). A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. *Science* 742(307): 1625–1630.

Rodríguez-Cuevas S, Macías CG, Franceschi D, and Labastida S (2001). Breast carcinoma presents a decade earlier in Mexican women than in women in the United States or European countries. *Cancer* 91(4): 863-868.

Romieu I, Hernández M, Lazcano E (1996). Breast cancer and lactation history in Mexican women. *Am J Epidemiol* 143(6): 543-552.

Santner SJ, Chen S, Zhou D, Korsunsky Z, Martel J, Santen RJ (1993). Effect of androstenedione on growth of untransfected and aromatase-transfected MCF-7 cells in culture. *J Steroid Biochem Mol Biol* 44(4-6): 611–616.

Sasano H, Okamoto M, Mason JI, Simpson ER, Mendelson CR, Sasano N, Silverberg SG (1989). Immunolocalization of aromatase, 17-alpha-hydroxylase and side-chain-cleavage cytochromes P-450 in the human ovary. *J Reprod Fertil* 85(1): 163–169.

Sasano H, Uzuki M, Sawai T, Nagura H, Matsunaga G, Kashimoto O, Harada N (1997). Aromatase in human bone tissue. *J Bone Miner Res* 12(9): 1416-23.

Schmid K, Wang X, Haitel A, Sieghart W, Peck-Radosavljevic M, Bodingbauer M, Rasoul-Rockenschaub S, Wrba F (2007). KiSS-1 overexpression as an independent prognostic marker in hepatocellular carcinoma: an immunohistochemical study. 450(2): 143-149.

Schweikert HU, Milewich L, Wilson JD (1976). Aromatization of androstenedione by cultured human fibroblasts. *J Clin Endocrinol Metab* 43(4): 785–795.

Shirasaki F, Takata M, Hatta N, Takehara K (2001). Loss of expression of the metastasis suppressor gene KiSS1 during melanoma progression and its association with LOH of chromosome 6q16.3-q23. *Cancer Res* 61(20): 7422-7425.

Smith JT, Dungan HM, Stoll EA, Gottsch ML, Braun RE, Eacker SM, Clifton DK, Steiner RA (2005). Differential regulation of KiSS-1 mRNA expression by sex steroids in the brain of the male mouse. *Endocrinology* 146(7): 2976-2984.

Soule HD, Vazquez J, Long A, Albert S, Brennan M (1973). A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 51(5): 1409-1416.

Tena-Sempere M (2006). GPR54 and kisspeptin in reproduction. *Human Reproduction Update* 12(5): 631-639.

Thomas P, Pang Y, Filardo EJ and Dong J (2005). Identity of an estrogen membrane receptor coupled to a G protein in human breast cancer cells. *Endocrinology* 146(2): 624-632.

Vivacqua A, Bonofiglio D, Recchia AG, Musti AM, Picard D, Andò S and Maggiolini M (2006). The G protein-coupled receptor GPR30 mediates the proliferative effects induced by 17beta-estradiol and hydroxytamoxifen in endometrial cancer cells. *Mol Endocrinol* 20(3): 631-646.

Yan C, Wang H, Boyd DD (2001). KiSS-1 represses 92-kDa type IV collagenase expression by down-regulating NF-kappa B binding to the promoter as a consequence of Ikappa Balpha -induced block of p65/p50 nuclear translocation. *J Biol Chem* 276(2): 1164-1172.

Wang C, Prossnitz ER and Roy SK (2007). Expression of GPR30 in the hamster ovary: differential regulation by gonadotropins and steroid hormones. *Endocrinology* 148(10): 4853-4864.

Wen-Ling L, Ming-Huei C, Hsiang-Tai C and Peng-Hui W (2008). The role of selective estrogen receptor modulators on breast cancer: from tamoxifen to raloxifene. *Taiwan J Obstet Gynecol* 47(1): 24-31.

Índice de figuras

Figura 1.	Curva de disociación para β -actina, <i>KISS1</i> y <i>KISS1R</i> .	20
Figura 2.	Efecto inhibitorio del 17 β -Estradiol sobre la expresión relativa del mRNA de <i>KISS1</i> en células MCF-7.	21
Figura 3.	Efecto inhibitorio del 17 β -Estradiol-BSA sobre la expresión relativa del mRNA de <i>KISS1</i> en células MCF-7.	22
Figura 4.	Efecto inhibitorio del G-1 sobre la expresión relativa del mRNA de <i>KISS1</i> en células MCF-7.	23
Figura 5.	Efecto inhibitorio del Tamoxifeno sobre la expresión relativa del mRNA de <i>KISS1</i> en células MCF-7.	24
Figura 6.	Efecto inhibitorio del 4-Hidroxitamoxifeno sobre la expresión relativa del mRNA de <i>KISS1</i> en células MCF-7.	25
Figura 7.	Efecto estimuladorio del 17 β -Estradiol sobre la expresión relativa del mRNA de <i>KISS1R</i> en células MCF-7.	26
Figura 8.	Efecto nulo del 17 β -Estradiol-BSA sobre la expresión relativa del mRNA de <i>KISS1R</i> en células MCF-7.	27
Figura 9.	Efecto nulo del G-1 sobre la expresión relativa del mRNA de <i>KISS1R</i> en células MCF-7.	28
Figura 10.	Efecto nulo del Tamoxifeno sobre la expresión relativa del mRNA de <i>KISS1R</i> en células MCF-7.	29
Figura 11.	Efecto inhibitorio del 4-Hidroxitamoxifeno sobre la expresión relativa del mRNA de <i>KISS1R</i> en células MCF-7.	30

Índice de tablas

Tabla 1.	Cálculos realizados para el análisis de resultados de la PCR-tiempo real.	27
Tabla 2.	Características de los oligonucleótidos iniciadores	18