



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**PAPEL DE LA ISOFORMA ER α Δ 5 SOBRE LA ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL
DEL RECEPTOR DE ESTRÓGENOS ALFA (ER α) EN CÁNCER DE MAMA**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Mitzli Xochitl Velasco López

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Alejandro Manuel García Carrancá
[Instituto de Investigaciones Biomédicas](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Elizabeth Langley Mc Carron
[Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas](#)

Dra. Marina Macías Silva
[Instituto de Fisiología Celular](#)

MÉXICO, D. F. AGOSTO, 2014



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.

PMDCB/569/2014...A

MITZLI XOCHITL VELASCO LÓPEZ
Alumno (a) de la Maestría en Ciencias Bioquímicas
P r e s e n t e

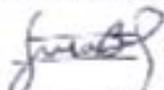
Los miembros del Subcomité Académico en reunión ordinaria del día 16 de Junio del presente, consideraron su solicitud de ASIGNACIÓN de **JURADO DE EXAMEN** para optar por el grado de **MAESTRO (A) EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)**, con la réplica de la tesis "Papel de la isoforma ER α Δ 5 sobre la actividad transcripcional del receptor de estrógenos alfa (ER α) en cáncer de mama", dirigida por el Dr. Alejandro Manuel García Carrancá.

De su análisis se acordó nombrar el siguiente jurado:

PRESIDENTE	Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes
VOCAL	Dr. Alfonso Dueñas González
VOCAL	Dr. Juan Carlos Gómez Martínez
VOCAL	Dra. Ana María Salazar Martínez
SECRETARIO	Dra. Ruth Jiménez Melgoza

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 18 de Junio de 2014.
COORDINADORA DEL SUBCOMITÉ ACADÉMICO
CIUDAD DE MÉXICO



DRA. BERTHA GONZÁLEZ PEDRAJO

C.c.p. Archivo

BGP/fgg

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Virus y Cáncer del Instituto Nacional de Cancerología (INCan) de la Secretaría de Salud bajo la dirección del Dr. Alejandro García Carrancá contando con el apoyo de la beca de posgrado de CONACyT y del proyecto “Células troncales, virus del papiloma humano y cáncer ano-genital” con número de registro 127722 en CONACyT.

Agradezco al Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas de la Facultad de Química de la UNAM por el apoyo proporcionado durante mi periodo de estudio dentro del programa.

Además, extiendo mi agradecimiento al Programa de Apoyo al Posgrado (PAEP) por otorgarme el apoyo económico para asistir al III Congreso Latinoamericano de Genética Humana y XXXVIII Congreso Nacional de Genética Humana que se realizó del 20 al 23 de noviembre del 2013 en Playa del Carmen, Quintana Roo, México.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento al Dr. Alejandro García Carrancá del Laboratorio de Virus y Cáncer del Instituto Nacional de Cancerología, por haber confiado en mí durante el proceso del presente trabajo, así como por su apoyo y dirección a lo largo de todo el desarrollo experimental.

También, le doy las gracias al comité tutorial integrado por la Dra. Elizabeth Langley McCarron del INCan y la Dra. Marina Macías Silva del Instituto de Fisiología Celular (UNAM) por su apoyo y las sugerencias hechas durante el desarrollo del proyecto.

De la misma forma agradezco al Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes de la Facultad de Química, al Dr. Alfonso Dueñas González del INCan, al Dr. Juan Carlos Gómora Martínez del Instituto de Fisiología Celular, a la Dra. Ana María Salazar Martínez del Instituto de Investigaciones Biomédicas y a la Dra. Ruth Jaimez Melgoza de la Facultad de Medicina por su paciencia, disponibilidad y generosidad al formar parte del jurado de examen de maestría.

Por último, agradezco al Dr. Alfonso León del Río por todas las facilidades proporcionadas durante mi estancia en su laboratorio, así como por su amabilidad y apoyo durante ese periodo de tiempo.

ÍNDICE GENERAL

	Página
Resumen	-
I. Introducción	1
I.2. Estradiol y receptor de estrógenos (ER)	1
I.3. Procesamiento alternativo del receptor de estrógenos	4
I.4. Tratamiento antiestrógeno	7
II. Justificación del trabajo	12
III. Hipótesis	13
IV. Objetivo general	13
V. Objetivos particulares	13
VI. Metodología	14
1. Cultivos celulares	14
2. Extracción de RNA total	14
3. Tratamiento con DNasa I	15
4. Síntesis de cDNA	15
5. Expresión de la isoforma ER α Δ 5 en líneas celulares de cáncer de mama	16
6. Ensayo de viabilidad celular con 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT).	16
7. Obtención de la construcción ER α Δ 5	17
8. Secuenciación	18
9. Ensayo de actividad transcripcional	18
VII. Resultados	21
1. Caracterización de las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB 2331 en base a la expresión de ER α y Δ 5.	21
2. Obtención de la Isoforma ER α Δ 5.	23
3. Actividad transcripcional del receptor ER α Δ 5.	26
VIII. Discusión	28
IX. Conclusiones	31
X. Referencias	32
XI. Anexo I	38

ÍNDICE DE FIGURAS

Título de figura	Página
Figura 1. Los estrógenos presentan distintos mecanismos de acción.	2
Figura 2. Estructura del gen que codifica para el receptor de estrógenos alfa, ESR1	3
Figura 3. Dominios estructurales y funcionales de la proteína ER α .	4
Figura 4. Estructura del ER α y de la variante $\Delta 5$.	7
Figura 5. Estructura química del 17 β -estradiol, fulvestrant y tamoxifen.	8
Figura 6. Mecanismo de acción de los Moduladores Selectivos del Receptor de Estrógenos alfa (SERMs) en el tratamiento de cáncer de mama.	9
Figura 7. Mecanismo de acción de Fulvestrant.	10
Figura 8. Las células MCF-7 expresan los transcritos ER α y $\Delta 5$	21
Figura 9. La viabilidad de las células MCF-7 es afectada por el tratamiento hormonal y antiestrogénico.	22
Figura 10. La viabilidad de las células MDA-MB 231 no es afectada por el tratamiento hormonal y antiestrogénico	23
Figura 11. Proceso de obtención de la isoforma ER $\alpha\Delta 5$.	24
Figura 12. Esquema del análisis de secuencia de ER α y $\Delta 5$.	25
Figura 13. La isoforma $\Delta 5$ disminuye la actividad transcripcional del receptor de estrógenos completo	26
Figura 14. Mecanismo de regulación transcripcional de la variante $\Delta 5$ sobre el receptor de estrógenos alfa (ER α).	27

ÍNDICE DE TABLAS

Título de tabla	Página
Tabla 1. Oligonucleótidos diseñados para las reacciones de mutagénesis sitio dirigida	17
Tabla 2. Condiciones de transfección de los receptores y reporteros por pozo.	19
Tabla 3. Secuencias de las construcciones pcDNA3.1(+)-ER α y $\Delta 5$	25

Papel de la isoforma ER α Δ 5 sobre la actividad transcripcional del receptor de estrógenos alfa (ER α) en cáncer de mama

El receptor de estrógenos alfa (ER α) es una proteína conformada por seis dominios, A-F. Los dominios A/B contienen la función de transactivación AF-1. En el dominio C o de unión al DNA (DBD), se encuentran dos “dedos de zinc” que son los responsables del reconocimiento y unión a los elementos de respuesta a estrógenos (EREs). El dominio D funciona a manera de bisagra, que facilita el plegamiento de la proteína. En la región E/F o dominio de unión a ligando (LBD) se encuentra la función de transactivación AF-2.

Los transcritos de ER α sufren un procesamiento alternativo que conduce a la formación de isoformas, una de las cuales genera la proteína ER α Δ 5, que al carecer del exón 5, pierde parte del LBD pero conserva la habilidad para unirse al DNA y su actividad dependiente de AF-1. Esta isoforma se expresa en tumores con fenotipo ER-/PR+. Las consecuencias de su expresión aún no se conocen, pero consideramos que podría tener un efecto importante sobre la actividad del receptor alfa completo, que se verá reflejado en la expresión de genes de respuesta a estrógenos en cultivos de líneas celulares de cáncer de mama (CM). Por lo tanto, el estudio de isoformas de ER α , como Δ 5, proporcionara información acerca del mecanismo de regulación transcripcional de ER α en cáncer de mama. En base a lo anterior, primero se generó el cDNA de la isoforma por mutagénesis sitio dirigida a partir de la secuencia de ER α .

Antes de evaluar la actividad de Δ 5, se seleccionaron líneas celulares de CM ER-positivo y negativo, MCF-7 y MDA-MB 231, respectivamente. Para corroborar las características de cada línea celular se analizó la expresión de los mRNA de ER α y ER α Δ 5, por medio de RT-PCR se confirmó la expresión de los receptores en células MCF-7 y la ausencia de estos en células MDA-MB 231. Además, se examinó la respuesta al tratamiento con Estradiol (E2), Tamoxifen, Fulvestrant y/o Doxorubicina por el método de MTT. En células MCF-7, la viabilidad disminuye 35 % y 52 % después del tratamiento por 96 horas con tamoxifen y fulvestrant, respectivamente. En los tratamientos con E2, utilizado como control positivo en estas células, se observa un incremento del 21 % con respecto a los controles. Por el contrario, en las células MDA-MB 231 la viabilidad de los cultivos no es afectada por el tratamiento antiestrogénico.

Posteriormente, para evaluar la relevancia biológica de Δ 5 se realizaron ensayos de actividad transcripcional *in vitro*, empleando un gen reportero de luciferasa con dos EREs. Nuestros resultados muestran que ER α incrementa 3.4 veces la expresión de luciferasa en respuesta al estímulo hormonal, por el contrario en los cultivos transfectados con Δ 5 no se observa expresión significativa de luciferasa comparada con el control pcDNA3.1+. En las cotransfecciones ER α :ER α Δ 5, la actividad de proteína completa disminuye hasta el 70 % en presencia y ausencia de estímulo hormonal.

En base a lo anterior, concluimos que el receptor Δ 5 no posee actividad transcripcional AF-1 en nuestro modelo de estudio. Sin embargo, los resultados obtenidos representan un mecanismo de regulación transcripcional mediada por la interacción proteína-proteína, donde

ER α Δ 5 ejerce un efecto dominante negativo sobre el receptor completo, al formar heterodímeros ER α :ER α Δ 5 u homodímeros ER α Δ 5 que son incapaces de promover la transcripción del gen reportero.

I. INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama (CM) es la neoplasia diagnosticada con mayor frecuencia en la población femenina del mundo. En México, a partir de 2006, es la primera causa de muerte por tumores en mujeres entre 30 y 54 años desplazando al cáncer cérvicouterino ^{1,2}

Toda mujer tiene algún riesgo de desarrollar cáncer de seno a lo largo de su vida y este se incrementa dramáticamente con los años. Se estima que el 5 al 10% de los tumores de mama tienen un origen hereditario, de los cuales alrededor del 30% se deben a mutaciones en los genes BRCA1 y BRCA2 ³. Al igual que en otros tipos de cáncer existen factores que pueden contribuir a su etiología, tales como la exposición a radiaciones ionizantes, ingesta de alcohol y tabaco ^{4,5}, así como la obesidad. Particularmente, esta neoplasia se encuentra asociada a la regulación hormonal, específicamente de estrógenos. Es decir, cuanto más tiempo una mujer ha estado expuesta a estrógenos, mayor será el riesgo de presentar la enfermedad. De tal forma que, una menarquía temprana (antes de los 12 años) y menopausia tardía (después de los 55 años), nuliparidad, retardo en el nacimiento del primer hijo (después de los 30 años) y uso de terapia hormonal de reemplazo, aumenta considerablemente la susceptibilidad de padecer la enfermedad ^{4,6}. Cabe mencionar que el índice de masa corporal es de particular atención en este padecimiento ya que las hormonas esteroideas (estrógenos, progesterona y testosterona) se generan a partir del colesterol en centros fisiológicos específicos como los ovarios y/o testículos, lo cual condiciona de forma importante la producción elevada de estrógenos ⁴.

I.2. ESTRADIOL Y RECEPTOR DE ESTRÓGENOS (ER)

El estradiol (E2) es una hormona esteroidea que se sintetiza principalmente en los ovarios y está involucrada en varios procesos fisiológicos como el desarrollo fetal, establecimiento y mantenimiento de las características sexuales secundarias y del ciclo reproductivo, el metabolismo celular de hígado, hueso y adipocitos, también en la actividad cardiovascular, neuronal e inmunológica. Por otra parte, se ha establecido que los estrógenos también participan en varios procesos patológicos como cáncer de mama, ovario y endometrio, osteoporosis, arteriosclerosis y Alzheimer ⁷.

El mecanismo de acción de esta hormona se lleva a cabo a través de su unión con un receptor específico, llamado receptor de estrógenos (ER), que principalmente funciona como factor de transcripción (FT) uniéndose a secuencias específicas en el DNA llamadas elementos de respuesta a estrógenos (ERE), que se localizan en regiones promotoras o enhancer de diversos genes blanco (Figura 1) ⁸.

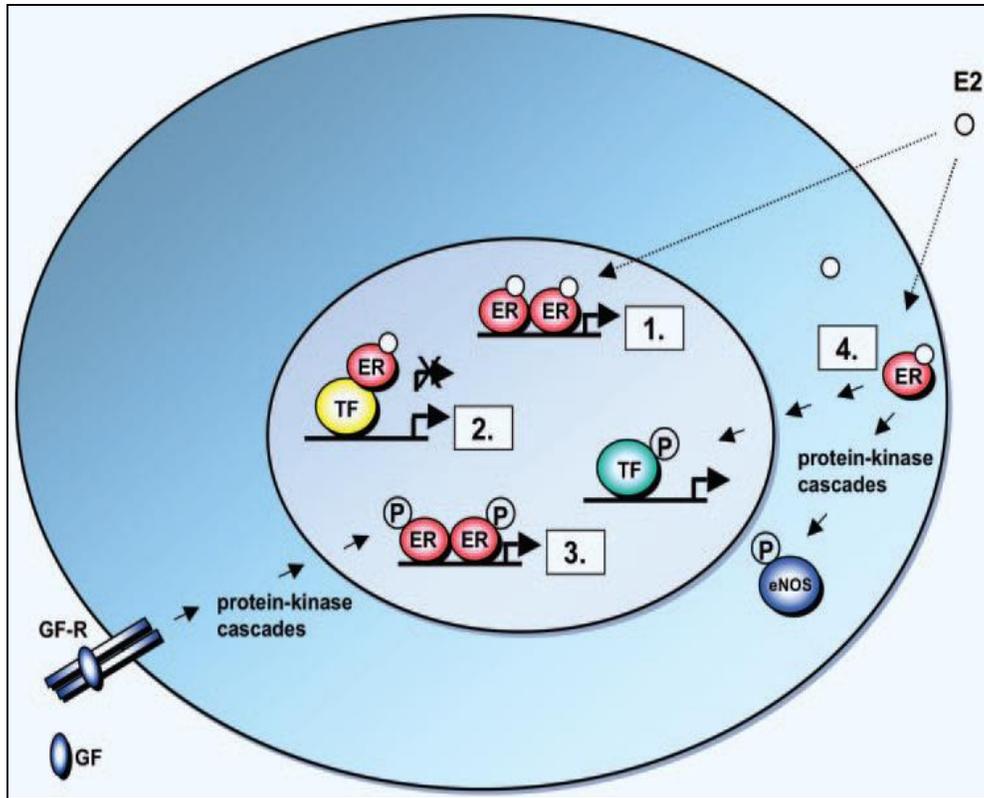


Figura 1. Los estrógenos presentan distintos mecanismos de acción. En la vía clásica (1), el complejo E2-ER dimeriza y se une directamente a los EREs de sus genes blancos. En el mecanismo no genómico (2), el complejo E2-ER se asocia a factores de transcripción (TF), responsables de la unión a promotores de genes blancos. En la vía 3, diferentes factores de crecimiento (GF) mediante sus receptores de membrana activan las cascadas de cinasas que fosforilan (P) y activan al ER, el cual dimeriza y reconoce sus consensos en los genes blanco. Por último, en el mecanismo 4, el complejo E2-ERmembranal activa las cascadas de cinasas, provocando el funcionamiento alterno de proteínas citoplasmáticas, por ejemplo, la activación de eNOS, o la regulación de la expresión genómica a través de la fosforilación y activación de TF⁹.

Actualmente, se conocen dos tipos de receptores denominados como ER α y ER β , codificados por los genes ESR1 (Figura 2) y ESR2¹⁰, localizados en los cromosomas 6q y 14q, respectivamente¹¹. Los ER se expresan principalmente en mama, útero, ovario, hueso, pulmones, tracto urogenital, sistema nervioso central y próstata. Específicamente, nos enfocaremos al ER α del cual se ha establecido el papel en la biología del cáncer de mama.

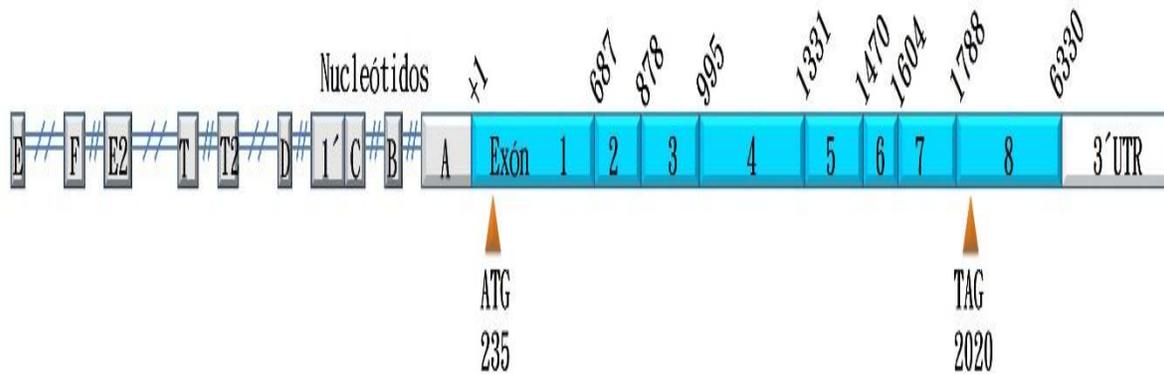


Figura 2. Estructura del gen que codifica para el receptor de estrógenos alfa, ESR1. La expresión del gen está regulada por diferentes regiones promotoras (bloques grises) que se localizan a la izquierda del sitio de inicio de la transcripción (+1). A demás, la región codificante está conformada por ocho exones (bloques azules), donde se encuentran el sitio de inicio de la traducción (ATG) y el tri-nucleótido del codón de paro (TAG) en los exones 1 y 8, respectivamente ¹².

El receptor está conformado por seis dominios (A-F). En el dominio A/B o región de activación independiente de ligando se localiza la función de transactivación AF-1 (Figura 3), que puede ser activada por algunos compuestos como AMPc, dopamina, vanadato, factor de crecimiento epidérmico (EGF) o factor de crecimiento insulínico (IFG), con lo cual se promueve la unión de coactivadores de receptores esteroideos (SRC-1) y otros como p68, o en circunstancias especiales, corepresores como Ssn3 y de esta forma regulan la actividad del receptor ⁸.

El dominio C o de unión al DNA (DBD), es una región principalmente hidrofóbica con un alto contenido de aminoácidos básicos y cisteínas, que interactúan con el Zn^{2+} , para formar dos de los llamados “dedos de zinc”, que son los responsables del reconocimiento y unión a los EREs ¹³. Por otra parte, el dominio D funciona a manera de bisagra, como un puente flexible capaz de unir el dominio de unión al ligando con el de fijación al DNA; posee secuencias de dimerización del receptor y de localización nuclear (NLS) ¹⁴. En la región E/F, que constituye la zona carboxilo-terminal del receptor, se encuentra el dominio de unión a ligando (LBD) la cual condiciona el grado de afinidad con la cual se unirá el ligando ¹⁵, regiones de dimerización y un dominio de transactivación denominado AF-2, en los cuales se localizan sitios de unión de coactivadores como SRC-1,-2,-3 y proteína de unión a CREB (CBP) así como de corepresores como TRIP1 y el represor de actividad de estrógenos (REA) ¹⁶ (Figura 3).

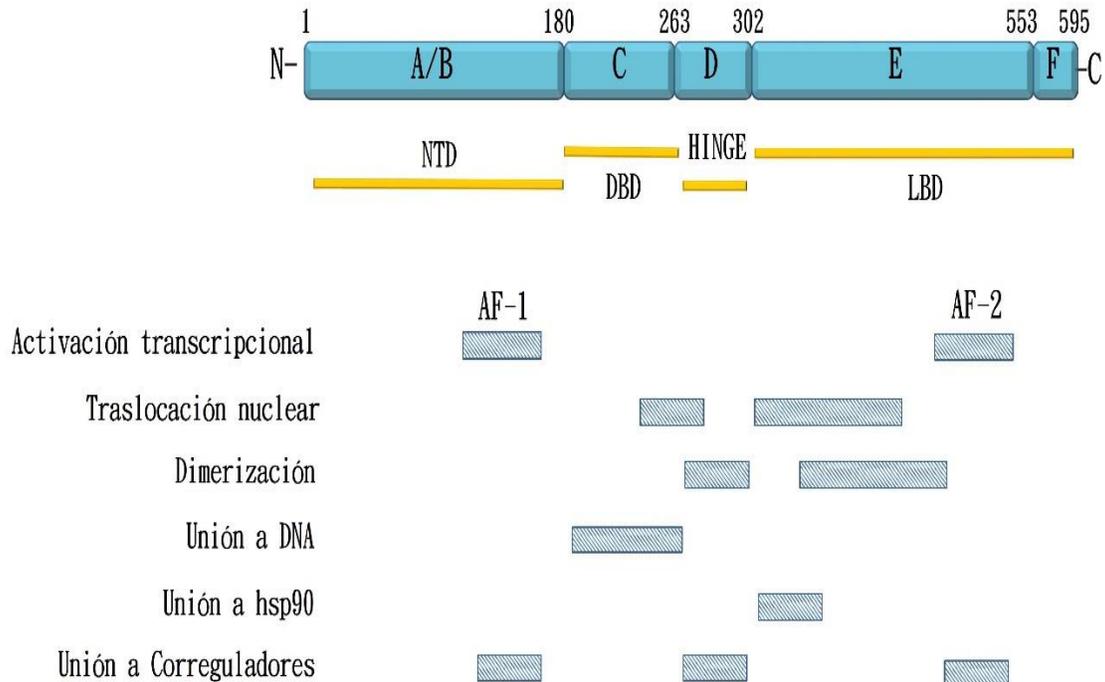


Figura 3. Dominios estructurales y funcionales de la proteína ER α . A. La proteína tiene 595 aminoácidos que conforman los cinco dominios funcionales del receptor (A-F), en los que se localizan los sitios de activación transcripcional (AF-1 y AF-2), traslocación nuclear y unión al DNA, así como las regiones de interacción con proteínas de choque térmico (hsp90) y correguladores (barras azul claro) ¹¹.

I.3. PROCESAMIENTO ALTERNATIVO DEL RECEPTOR DE ESTRÓGENOS

La mayoría de los esfuerzos por comprender el mecanismo de acción del ER α se han enfocado en determinar la presencia de mutaciones puntuales en la región codificante que pudieran afectar la actividad del receptor; sin embargo, estos acercamientos no han arrojado resultados contundentes que expliquen la resistencia a tratamientos antiestrogénicos por lo cual se ha incrementado el interés por el procesamiento alternativo del mensajero del receptor e incluso a las modificaciones post-traduccionales del mismo para tratar de dilucidar mejor la biología del receptor en el cáncer de mama.

Se han detectado isoformas de RNA mensajero del ER α en diferentes tipos de tejidos normales, como el de mama, endometrio, hipófisis, musculo liso y células mononucleares de sangre periférica. Además, en patologías como el cáncer de mama, endometrial, meningiomas y otro tipo de enfermedades como lupus eritematoso también se han encontrado diversas isoformas. En la mayoría de los casos se ha observado que el mensajero completo de ER (ER wt) es co-expresado con otras isoformas ¹⁷.

Se han reportado un gran número de variantes de mRNA generadas por *splicing*, con pérdida o duplicación de regiones exónicas. Aunque no está claro si uno o todos los RNA mensajero son traducidos *in vivo*, las proteínas sintetizadas pierden algún dominio funcional del ER_{wt}, que en ensayos *in vitro* han demostrado un funcionamiento alterado, como su incapacidad de entrar al núcleo en ausencia o presencia del ligando, afectar el plegamiento y la subsecuente dimerización de la proteína, así como la interacción con proteínas de choque térmico y otros factores de transcripción ¹⁸.

Entre las variantes reportadas se encuentran:

- ER α Δ 2. El transcrito codifica para la proteína truncada que posee solo los dominios A y B del receptor de estrógenos. A pesar de que la proteína carece de la región carboxilo terminal, se ha reportado que reprime la transcripción mediada por Fos en células HeLa ¹⁹. ER α Δ 2 no se está involucrado en la resistencia al tamoxifen ya que no existe diferencia en la expresión de la variante en células MCF-7 sensibles a tamoxifen y células resistentes al fármaco ²⁰. Se ha detectado su expresión en tejido endometrial normal pero no bajo condiciones de hiperplasia o adenocarcinoma endometrial ²¹. Además, se expresa en enfermedades como cáncer de mama ²² y lupus eritematoso sistémico, pero no existe una asociación entre la expresión relativa de la variante Δ 2 y el estado de la enfermedad ²³. Estos datos sugieren que la expresión de la variante Δ 2 podría estar regulada de forma tejido-específica y probablemente no está implicada en la tumorigenesis.
- ER α Δ 3. Se identificó en la línea celular de cáncer de mama T47D. La proteína Δ 3 pierde uno de los dos dedos de zinc que forman el DBD, por lo tanto es incapaz de unirse al DNA y actúa como una variante dominante negativa al reprimir la actividad transcripcional inducida por estrógenos por la formación de heterodímeros con el receptor de estrógenos completo ²⁴. La sobre-expresión de la isoforma Δ 3 en células MCF-7 reduce su capacidad para formar colonias en ensayos de agar suave, así como la característica invasiva de las células ²⁵.
- ER α Δ 4. El RNA mensajero carece del exón 4 y codifica para una proteína que carece de señal de localización nuclear, dominio AF-2 y parte de dominio de unión al ligando. Estudios realizados por Koehorst y colaboradores demuestran que la variante no tiene ningún efecto sobre la actividad transcripcional del receptor completo, por lo tanto no participa en la progresión de tumores de mama ²⁶.
- ER α Δ 7. La proteína carece del dominio AF-2 y de una porción del dominio de unión al ligando ²⁷. La expresión transitoria de ER α Δ 7 en células HeLa demuestran que cantidades crecientes del receptor Δ 7 provocan una inhibición progresiva de la actividad transcripcional dependiente de estrógenos de ER α y ER β sobre sus EREs ²⁸. A pesar de su expresión en tumores y líneas celulares de cáncer de mama, no se encuentra relacionado con la resistencia al tamoxifen ²⁰.
- ER α Δ 80. La isoforma ER α Δ 80 fue detectada en la línea celular MCF7:2A. Es producida por una duplicación de los exones 6 y 7. El análisis de la secuencia de esta

variante demuestra que la duplicación es única y no causa la ruptura del marco de lectura de la proteína²⁹. Hasta ahora no se ha reportado la función de este receptor.

- Además, se ha reportado la existencia de isoformas con duplicaciones del exón 6 o inserciones de pares de bases relacionadas con este. Por ejemplo, la proteína generada por la duplicación del exón 6 carece de los dominios de dimerización y AF-2³⁰.

Otra de las isoformas de receptor de estrógenos generada por *splicing* alternativo y de particular interés³¹ en este trabajo es el receptor ER α Δ 5.

Isoforma ER α Δ 5

La proteína denominada ER α Δ 5 carece del exón 5 y es más pequeña como consecuencia de un codón de paro prematuro, debido al origen de un nuevo marco de lectura por la unión del exón 4 con el 6 (Figura 4). A pesar de que la proteína resultante (41 KDa) pierde gran parte del LBD, conserva la habilidad de unirse al DNA. En sistemas de expresión en levaduras (*Sacharomyces cerevisiae*) se ha reportado que posee actividad transcripcional (AF-1) constitutiva en presencia o ausencia de estrógenos e incluso en algunas líneas celulares de cáncer de mama transfectadas^{31,32}. Estudios *in vitro* e *in vivo* sustentan que la actividad del ER puede ser regulada también por vías de señalización de factores de crecimiento como epidérmico (EGF), insulínico (IGF) y el transformante alfa (TGF- α)¹⁹, lo que permite suponer que estas vías también podrían estar participando en la adquisición de actividad transcripcional de la variante.

Esta variante del mensajero del receptor de estrógenos fue identificada y detectada en abundancia en tumores con fenotipo ER-/PR+. Posteriormente, Zhang y colaboradores, por medio de ensayos de protección a ribonucleasa, reportaron la co-expresión del transcrito ER wt y de la variante ER α Δ 5 en tumores con fenotipo ER+/PR+ y ER+/PR-. En tanto, la correspondiente proteína ER α Δ 5 ha sido detectada en la línea celular de cáncer de mama BT-20, la cual ha sido clasificada como ER-negativa³².

Las consecuencias de su expresión aún no se conocen, pero se infiere que si la variante confiere una ventaja selectiva durante la progresión del tumor, las células que sobre-expresan esta isoforma podrían predominar y resultar en un fenotipo más agresivo³³. En un estudio alterno Daffada y colaboradores encontraron que hay relación entre los niveles de expresión de ER α Δ 5 elevados y los tumores resistentes al tamoxifen en cáncer de mama³⁴.

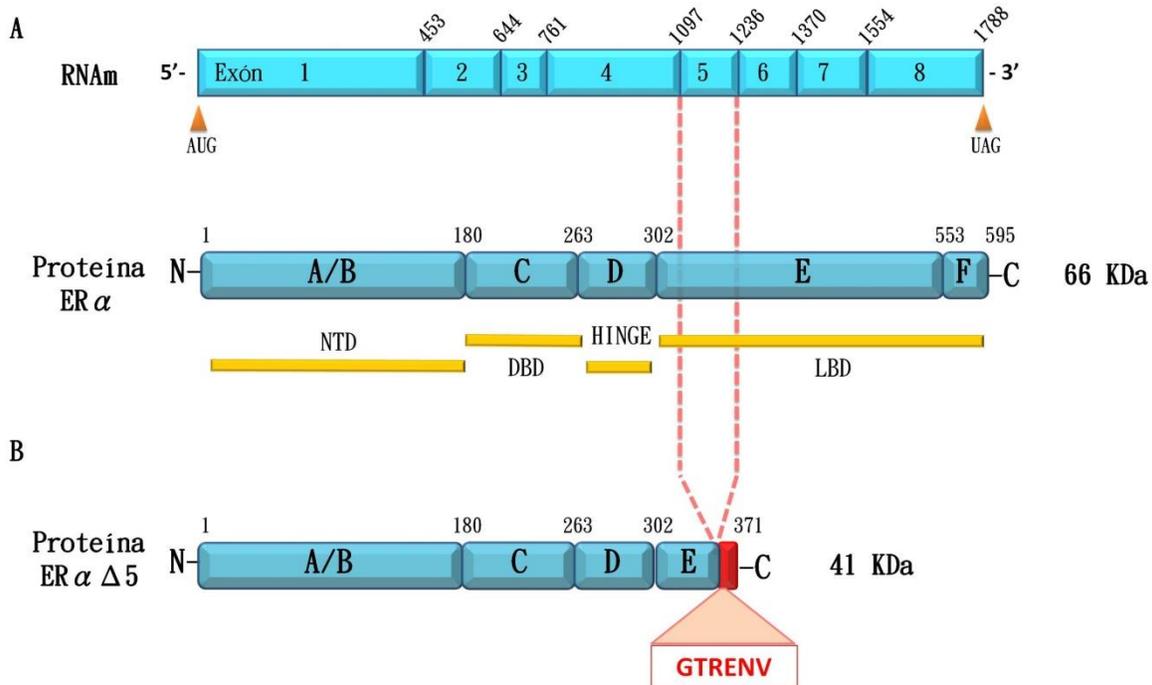


Figura 4. Estructura del ER α y de la variante $\Delta 5$. A. RNA mensajero codifica para los dominios estructurales y funcionales del Receptor de Estrógenos alfa. B. Isoforma ER $\alpha\Delta 5$, pierde el exón 5 como consecuencia del splicing alternativo que sufre el transcrito completo del receptor alfa, originada por un codón de paro prematuro debido al nuevo marco de lectura (GTRENV)³¹.

I.4. TRATAMIENTO ANTIESTROGÉNICO

Los carcinomas de mama representan una enfermedad heterogénea, debido a los diferentes sub-tipos de tumores que se han identificado con base en criterios patológicos estándares, en los que se incluye morfología celular, el fenotipo invasivo y el establecimiento de marcadores clínicos y moleculares, como el llamado triple marcador que consta del receptor de estrógenos alfa (ER α), receptor de progesterona (PR) y el receptor de factor de crecimiento epidermal tipo 2 (HER2/neu). Entre los anteriores, el ER α adquiere gran importancia debido a que del 60 a 70% de los tumores son positivos a esta proteína, lo cual permite aplicar una terapia dirigida hacia el bloqueo de dicho receptor, de tal manera que pacientes con tumores ER+ podrán responder favorablemente a las terapias endócrinas^{35,36}.

El descubrimiento y desarrollo de antiestrógenos para su uso en el tratamiento contra tumores de mama ER (+), llevó a un nuevo enfoque de terapia dirigida con pocos efectos secundarios comparados con la quimioterapia tradicional. Actualmente, en el tratamiento de cáncer de mama se emplean fármacos como: inhibidores de aromatasa (AIs, por sus siglas en inglés), tamoxifen y fulvestrant⁸ (Figura 5).

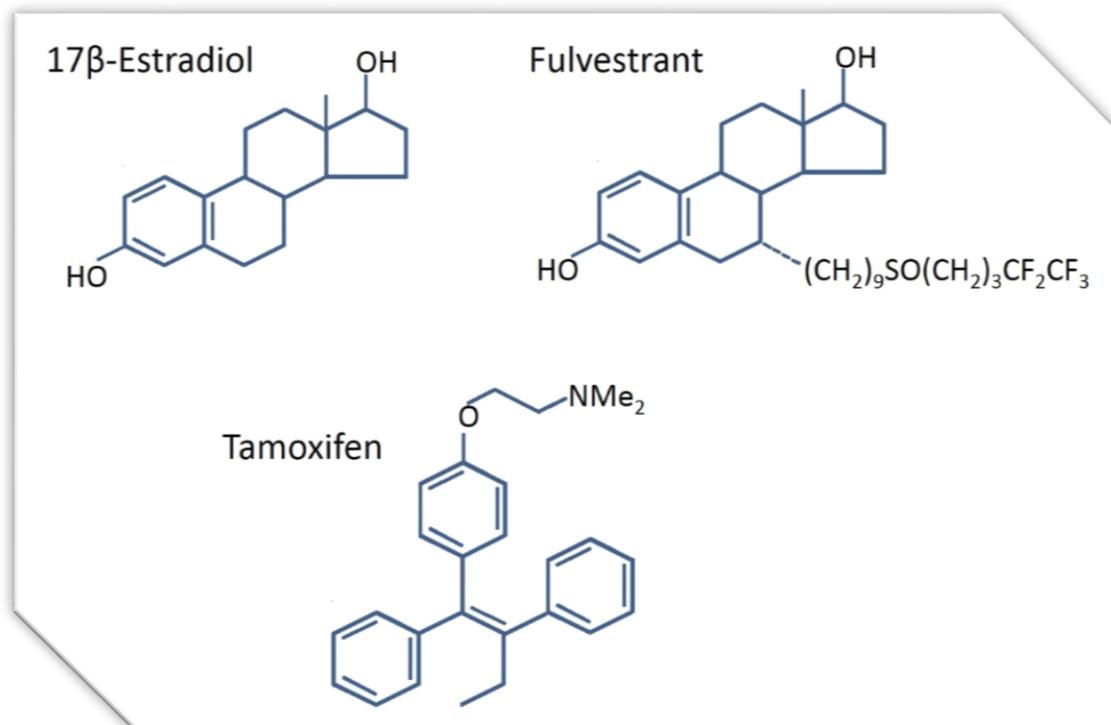


Figura 5. Estructura química del 17β-estradiol, fulvestrant y tamoxifen ^{37 38}.

El tamoxifen es un modulador selectivo del receptor de estrógenos (SERMs, por sus siglas en inglés) que compite con el estradiol por la unión al ER α . Es considerado como antagonista parcial, ya que bloquea únicamente la función de activación transcripcional 2 (AF-2) de la proteína, esto permite la activación de AF-1, la dimerización del receptor y su unión a genes regulados por estrógenos. En células de mama, la competencia por la unión a la proteína evita la formación del complejo de transcripción mediada por el ER α , bloqueando la expresión de genes implicados en la proliferación celular ^{39,40} (Figura 6).

La FDA en 1977 aprobó el uso de tamoxifen en el tratamiento cáncer de mama avanzado, en 1988 como adyuvante en cáncer primario y en 1990 como adyuvante en mujeres pre y post-menopáusicas con ganglios negativos ⁴¹. Se ha observado en tumores en etapa temprana ER+, que el tamoxifen reduce el 39% en la tasa anual de recurrencia y el 31% de la tasa de mortalidad ⁴².

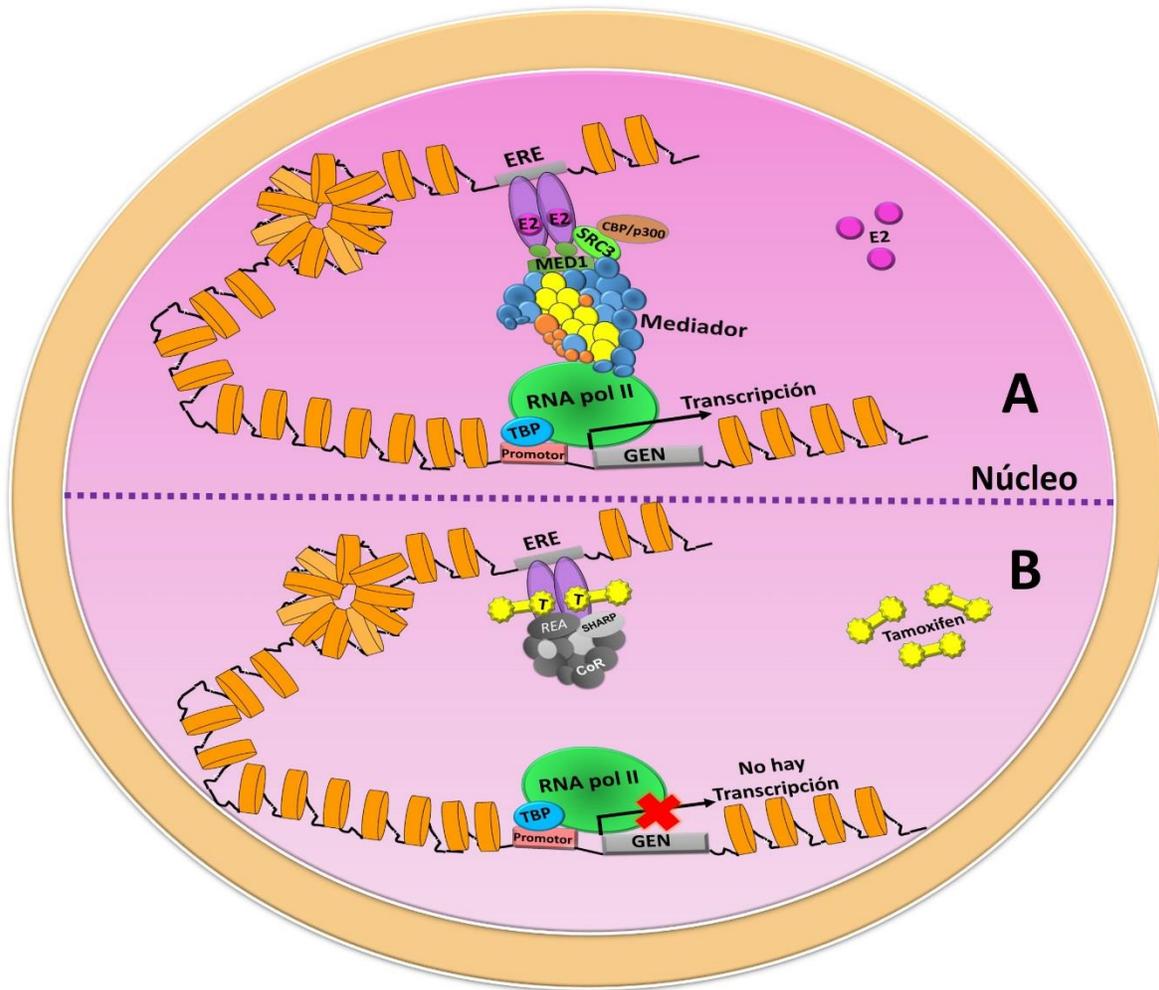


Figura 6. Mecanismo de acción de los Moduladores Selectivos del Receptor de Estrógenos alfa (SERMs) en el tratamiento de cáncer de mama. A. La unión de estrógenos (E2) al ER genera un cambio conformacional en el LBD, formando una cavidad hidrofóbica que permite la interacción con coactivadores (CoA) como MED1, SRC-3 y CBP/p300, facilitando el reclutamiento de la maquinaria general de la transcripción. **B.** La regulación negativa, generada por la unión de antiestrógenos como tamoxifén (T), miembro de los SERMs, causa un cambio conformacional en AF-2 diferente al creado por la unión de ligandos agonistas lo cual bloquea la interacción con coactivadores de AF-2 y permite la entrada de correpresores (CoR), que bloquean la transcripción de los genes blancos.

Por otra parte, el Fulvestrant (7α -alquilsulfinilo) o ICI 182,780 es un análogo del 17β -estradiol, cuya estructura es diferente al tamoxifén, raloxifén u otros SERMs (Figura 5). Este fármaco es un nuevo tipo de antagonista del ER, al igual que el tamoxifén, inhibe competitivamente la unión del estradiol al ER (Figura 7). Sin embargo, en ensayos *in vitro* se ha determinado que el ICI 182,780 tiene mayor afinidad (0.89) que el tamoxifén (0.025) por el ER, comparada con la afinidad de unión de la hormona (1.0)⁴³

El complejo ER α -fulvestrant inhibe la localización nuclear del receptor y si algún complejo llega a entrar al núcleo es transcripcionalmente inactivo ya que AF-1 y 2 se encuentran inhabilitadas ³⁷. Finalmente, el complejo promueve la degradación acelerada del receptor comparada con la inducida por la hormona así como por los SERMs ⁴⁴.

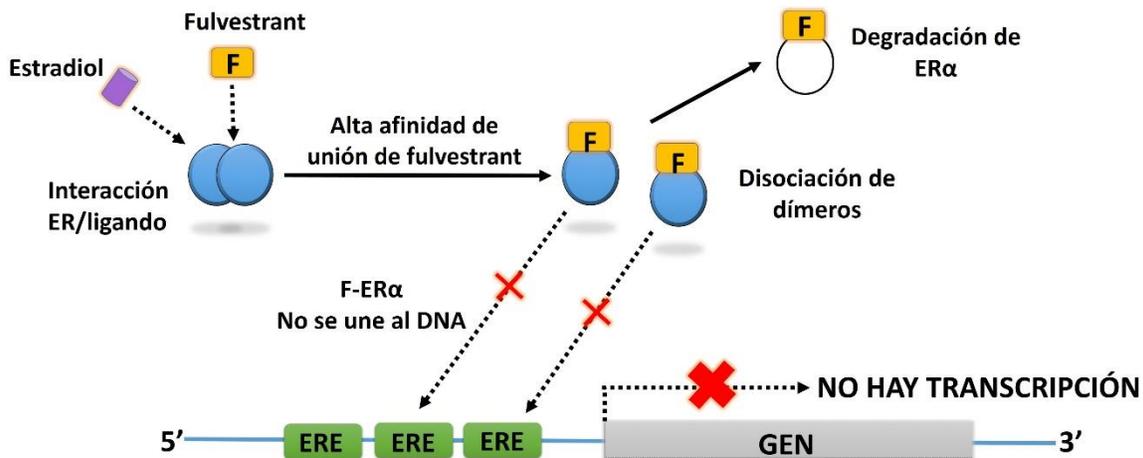


Figura 7. Mecanismo de acción de fulvestrant. El fulvestrant (F) inhibe competitivamente la unión del estradiol al receptor de estrógenos al receptor alfa (ER α), la unión al receptor provoca la disociación de dímeros y bloquea su entrada al núcleo, pero si algún complejo Fulvestrant-ER α entra al núcleo estos son transcripcionalmente inactivos. Finalmente, los complejos Fulvestrant-ER son muy inestables lo que lleva a una degradación acelerada de la proteína ER α , comparada con la inducida por unión de estrógenos o tamoxifen ⁴⁵.

Estudios en la línea celular de cáncer de mama MCF-7 han demostrado que el ICI 182,780 disminuye significativamente los niveles celulares de ER e inhibe la expresión del receptor de progesterona (PR), pS2, cathepsina D y otros genes regulados por estrógenos ⁴⁶. Además, ensayos de citometría de flujo demuestran que este fármaco incrementa la proporción de células en G0/G1 y disminuye la proporción de células capaces de continuar con la síntesis de DNA. Por otro lado, se ha demostrado la pérdida del cruce de resistencia entre el tamoxifen y el fulvestrant en células MCF-7/TAM^{R-1} ^{43,45}.

Los efectos biológicos y anti-tumorales del fulvestrant han sido evaluados en estudios que involucran mujeres posmenopáusicas con cáncer de mama primario. Uno de ellos consistió en comparar los efectos de la aplicación diaria del fármaco (6 u 8 mg) con respecto a los controles sin tratamiento durante 7 días antes de la cirugía, en un grupo de 56 mujeres. En las pacientes con tumores ER-positivo (28/56), el antiestrógeno reduce significativamente el índice de expresión del ER (0.73 vs 0.02, pre- y post-tratamiento, respectivamente; P<0.001) y frecuentemente anula la expresión del PR ⁴⁷.

En otro estudio, comparan los efectos de dosis únicas de fulvestrant (50, 125 y 250 mg) con un placebo durante 14-21 días, obteniendo que todas las dosis del fármaco producen una reducción estadísticamente significativa en la expresión del receptor comparada con la del placebo (50 mg: reducción del 32%, $P=0.026$; 125 mg: reducción del 55%, $P=0.0006$; 250 mg: reducción del 72%, $P=0.0001$)⁴⁸.

Debido a la complejidad de los tumores la respuesta al tratamiento es diversa. Actualmente, para reducir la mortalidad por cáncer de mama existe un interés por estudiar y caracterizar los tumores de mal pronóstico, para predecir su biología y así asegurar un tratamiento adecuado que permita mejorar el resultado de los pacientes.

Por lo anterior, y debido a que el ER α es clave para elegir el tratamiento de las pacientes que lo presentan, consideramos que evaluar el papel de las isoformas, ER α $\Delta 5$ y ER α $\Delta 7$, en cultivos de líneas celulares de cáncer de mama cuando éstas son tratadas con antiestrógenos es de gran relevancia para establecer mejores esquemas terapéuticos y de pronóstico de la enfermedad.

II. JUSTIFICACIÓN

En México, el cáncer de mama es la primera causa de muerte por tumores en mujeres entre 45 y 64 años ¹. Entre los factores que incrementan el riesgo de desarrollar esta enfermedad se encuentran la exposición a estrógenos y la administración de terapia hormonal de remplazo ^{5,49}. Estas hormonas ejercen su acción proliferativa al unirse a una proteína llamada receptor de estrógenos (ER α). Aproximadamente un 60-70% de los tumores de mama expresan ER α y responden satisfactoriamente a la terapia anti-hormonal, pero desarrollan resistencia con el tiempo a pesar de la continua expresión del receptor en el tejido. Esto sugiere que existen mecanismos distintos a la pérdida de expresión de ER α que son responsables de la resistencia al tratamiento.

Actualmente, se han identificado diferentes isoformas del ER α generadas por *splicing* alternativo que pierden el exón 3, 4, 5 y 7, respectivamente. Sin embargo, se conoce muy poco sobre las implicaciones biológicas de la expresión de estas variantes así como de su co-expresión con la proteína completa.

Entre las anteriores, la isoforma ER $\alpha\Delta 5$ fue identificada y detectada en tumores ER-negativo/PR-positivo ³¹ y se expresa en niveles significativamente altos en tumores clasificados como resistentes a tamoxifen ER-negativos/pS2-positivos y biopsias de pacientes con recurrencia ³⁴. En base a las investigaciones anteriores, la variante podría ser funcionalmente activa en carcinomas de mama ya que su expresión otorgaría el fenotipo PR+/pS2+, además podría estar asociada a la resistencia al tratamiento anti-hormonal. ER $\alpha\Delta 5$ representa una isoforma estable del receptor, que al igual que la proteína completa, se localiza eficientemente en el núcleo donde puede interactuar con el aparato transcripcional. Por lo tanto, el estudio del papel biológico de $\Delta 5$ arrojaría un importante avance sobre la función que desempeñan algunas isoformas de ER α sobre la regulación de la actividad transcripcional de la proteína completa en el desarrollo de cáncer de mama.

III. HIPÓTESIS

La isoforma ER α Δ 5 bloquea la actividad transcripcional del receptor de estrógenos alfa en células de cáncer de mama.

IV. OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto que tiene la expresión de la isoforma ER α Δ 5 sobre la actividad de ER α en células de cáncer de mama bajo estímulo hormonal.

V. OBJETIVOS PARTICULARES

- Corroborar la expresión de los transcritos ER α y Δ 5 en células de cáncer de mama.
- Evaluar la viabilidad de las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB 231 con tratamiento hormonal y antiestrogénico.
- Obtener la construcción de la isoforma ER α Δ 5 por mutagénesis sito dirigida.
- Secuenciar la construcción pcDNA3.1-ER α Δ 5 obtenida.
- Analizar la actividad transcripcional de los receptores ER α y Δ 5 en células MDA-MB 231.

VI. METODOLOGÍA

1) Cultivos celulares.

Se cultivaron las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB 231 con fenotipo ER-positivo y ER-negativo, respectivamente, en medio DMEM-F12 con rojo fenol suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 5% y 100 U/ml de bencil penicilina, a 37 °C en una atmósfera al 95% de O₂.

En los ensayos de viabilidad de celular y actividad transcripcional los cultivos se mantuvieron con medio DMEM sin rojo fenol suplementado con SFB al 2.5% tratado carbón activo (No. De producto C6241, Sigma) (Anexo I).

2) Extracción de RNA total.

Se realizó la extracción de RNA total con Trizol (Total RNA Isolation Reagent, Invitrogen) a partir de cultivos en monocapa de células MDA-MB 231 y MCF-7.

Primero, se removió el medio DMEM-12 de los cultivos, se lavaron 3 veces con PBS 1X frío. Se adicionó 1 mL de Trizol sobre la monocapa celular y con un gendarme las células fueron removidas de la superficie de la placa.

El lisado celular se colocó en dos tubos eppendorf con 500 µl cada uno, se adicionaron 200 µl de cloroformo en cada tubo y se homogenizaron por 15 segundos en vortex. Las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente por 2 minutos, después se centrifugaron a 12,000 xg por 15 minutos a 4°C, separándose así la fase acuosa de la orgánica.

Se recuperaron las fases acuosas, que contienen el RNA, en tubos nuevos y se les añadió 500 µl de isopropanol para precipitar el RNA, incubando a temperatura ambiente por 10 minutos. Las muestras se centrifugaron a 12,000 xg por 10 minutos a 4°C.

Al término de la centrifugación, se observó una pequeña pastilla blanca adherida a una de las paredes del tubo, se removió el sobrenadante con ayuda de la micropipeta y se adicionó 1 mL de etanol al 75%. Las muestras se mezclaron brevemente con vortex y se centrifugaron a 7500 xg por 5 minutos a 4°C. Posteriormente, se eliminó el sobrenadante y las pastillas de RNA se dejaron secar a temperatura ambiente por 8 minutos.

Por último, las pastillas de RNA se disolvieron en agua libre de RNAsas, se incubaron a 58°C por 12 minutos y cuantificaron en NanoDrop.Spectrophotometer ND-1000. Las muestras se almacenaron a -70°C hasta su uso.

3) Tratamiento con DNasa I.

Para eliminar fragmentos de DNA genómico que pudieron quedar en las muestras de RNA, éstas se trataron con DNasa I (#ENO521, Thermo Scientific) de la siguiente manera:

Se mezclaron 5 µg de RNA total de cada línea celular con 5 µl de buffer de reacción con MgCl₂ 10X, 5 µl de DNasa I y completando un volumen final de 50 µl con agua libre de RNAsas. Las mezclas se incubaron a 37°C por 30 minutos, después se añadió 5 µl de EDTA 50 mM en cada muestra y se incubaron a 65°C por 10 minutos, para inactivar a la enzima.

Por último, las muestras de RNA se purificaron siguiendo el método de TRIZOL, descrito en el punto 4.

4) Síntesis de cDNA.

La síntesis de cDNA se realizó siguiendo el protocolo descrito para Superscript II Reverse Transcriptase Kit (Invitrogen).

En un tubo para eppendorf se adicionaron los siguientes reactivos

RNA total	5 µg
Oligo dT (500 µg/mL)	1 µl
Mezcla de dNTPs 10 mM	1 µl
Agua DEPC	Volumen final de 12 µl

Las mezclas se incubaron a 65 °C por 5 minutos, después se colocaron en hielo por un minuto.

Se adicionaron los reactivos a las mezclas de reacción:

5X First-Strand Buffer	4 µl
DTT 0.1M	2 µl
RNaseOUT™ (40 U/µl)	1 µl

Los tubos se incubaron a 42 °C por 2 minutos. Después, se añadió 1 µl de la enzima SuperScript™ II RT a cada muestra y se mezclaron cuidadosamente por pipeteo. Se incubaron por 42°C por 50 minutos.

Las reacciones de síntesis de cDNA se inactivaron por calentamiento a 70°C por 15 minutos y se colocaron en hielo. Las muestras se colectaron en el fondo del tubo dando una ligera centrifugación.

Por último, las muestras se trataron con RNAsa H a 37°C por 20 minutos para eliminar restos de RNA en las muestras. Las muestras se almacenaron a -20°C hasta ser usadas.

5) Expresión de la isoforma ER α Δ 5 en líneas celulares de cáncer de mama.

Para comprobar la expresión de esta isoforma en las líneas celulares se utilizaron los siguientes oligonucleótidos:

- Sentido: GGAGACATGAGAGCTGCCAAC
- Antisentido: CCAGCAGCATGTCTGAAGATC

Los cuales generan fragmentos de 439 pb y 300 pb, que corresponden a la presencia del receptor de estrógenos- α y de la isoforma Δ 5, respectivamente.

Se prepararon reacciones de PCR empleando 80 ng de cDNA, 1 U de AmpliTaq Gold® DNA Polymerase (Applied Biosystems), dNTP's 200 μ M, MgCl₂ 2mM, buffer GeneAmp 10X y 10 pmol de los primers correspondientes en un volumen final de reacción de 25 μ l.

El programa de PCR fue el siguiente: Pre-incubación a 94°C, 7 min. Desnaturalización a 94°C, 30 seg. Temperatura de alineamiento 60°C y para β -actina 59°C, por 30 seg. Extensión a 72°C, 1 min. y 30 seg (isoformas completas), y 45 seg (fragmentos internos y actina). Extensión final a 72°C, 10 min. Se programarán 35 ciclos.

Los fragmentos amplificados se observaron en geles de agarosa al 1%, teñidos con Gel Red.

6) Ensayo de viabilidad con 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT).

Se sembraron 7.5 x 10³ células por pozo en placas de cultivo de 96 pozos. Se incubaron por 96 horas (con cambio de medio y/o tratamiento cada 24 horas) con 100 nM estradiol, 1 μ M tamoxifen, 1 μ M fulvestrant o 1 μ M doxorubicina. Empleando como control sin tratar a los cultivos con DMEM sin rojo fenol suplementado con 2.5% de suero fetal bovino (SFB) tratado con carbón activado, 100 U/ml de bencil penicilina y 100 mg/ml de estreptomycin; y como control del vehículo del fármaco se realizarán cultivos con dimetilsulfoxido (DMSO) al 0.1% por cada pozo.

Posteriormente, se adicionaron 10 μ l de una solución de MTT (5 mg/ml PBS) en cada pozo. Se incubaron durante una hora y 30 minutos bajo las mismas condiciones de crecimiento. Se retiró el medio con la solución de MTT y se adiciono 100 μ l de DMSO, la placa se incubó a temperatura ambiente y agitación moderada durante 3 minutos. La lectura se realizó en un espectrofotómetro EPOCH de placa con filtro de 570 nm.

Por último, se hizo el análisis estadístico de cada tratamiento con el programa ORIGIN® 9.0 Graphing and Analysis (OriginLab).

7) Obtención de construcción ER α Δ 5.

La isoforma ER α Δ 5 se obtuvo con el método de QuickChange II site-directed mutagenesis Kit (Stratagene), a partir del cDNA del ER α clonado en el vector pcDNATM3.1(+) (Invitrogen). Se diseñaron oligonucleótidos para insertar el sitio de restricción de la enzima KpnI en los extremos del exón 5 (Tabla 1).

Tabla1. Oligonucleótidos diseñados para las reacciones de mutagénesis sitio dirigida

<i>Nombre</i>	<i>Secuencia</i>
ER$\alpha$$\Delta$5 4k5-F	5'-GAG GGT GCC AGG GTA CCG CTT TGT GGA TTT G-3'
ER$\alpha$$\Delta$5 4k5-R	5'-CAA ATC CAC AAA GCG GTA CCC TGG CAC CCT C-3'
ER$\alpha$$\Delta$5 5k6-F	5'-CTC TTG GAC AGG GTA CCG AAC CAG GGA AAA TG-3'
ER$\alpha$$\Delta$5 5k6-R	5'-CAT TTT CCC TGG TTC GGT ACC CTG TCC AAG AG-3'
ER$\alpha$$\Delta$5 4k6 -F	5'-CGA AGA GGG TGC CAG GAA CCA GGG AAA ATG-3'
ER$\alpha$$\Delta$5 4k6-R	5'-CAT TTT CCC TGG TTC CTG GCA CCC TCT TCG-3'

*Oligo F: sentido; R: anti-sentido

Las reacciones de PCR se prepararon de la siguiente forma: 30 ng de pcDNA 3.1-hER α , 150 ng de cada oligonucleótido sentido y anti-sentido (tabla 1), 1 μ l dNTP's y 1 μ l PfuUltraTM high-fidelity (HF) DNA polymerase (2.5 U/ μ l). Las condiciones de PCR fueron las siguientes: 95°C por 30 segundos, 55°C por 1 minuto y 68°C por 8 minutos, durante 18 ciclos.

Al término de la reacción de PCR, las hebras de DNA metilado fueron digeridas con la enzima de restricción DpnI. Posteriormente, se transformaron células *E. coli* XL-1 Blue con 2 μ l del producto de PCR y las clonas se crecieron en agar LB con ampicilina (100 μ g/ml) a 37 °C por 12 h. Se seleccionaron 6 clonas y se realizó la extracción de DNA plásmido con base al protocolo de PureLink® Quick Plasmid Miniprep Kit (Invitrogen). Las muestras se almacenaron a -20 °C, hasta ser utilizadas como molde para las mutaciones siguientes.

Una vez insertados los sitios corte en los extremos del exón 5, se realizó la restricción con KpnI de los vectores pcDNA3.1-ER α Δ 5, para liberar el fragmento de 139 pb, que corresponde al exón 5. El vector sin exón 5 se re-ligó con Ligasa T4 y fue utilizado como

molde para la última PCR de mutagénesis, para eliminar el sitio de corte KpnI entre los exones 4 y 6.

Por último, las construcciones obtenidas se enviaron a secuenciar para corroborar la integridad de las secuencias.

8) Secuenciación.

Las reacciones de secuenciación se prepararon de la siguiente forma: 500 ng de DNA plasmídico, 1.5 µl de BigDye Terminator v3.1 Cyler, Secuencing buffer 1X, 10 pmol del oligonucleótido correspondiente sentido (GGAGACATGAGAGCTGCCAAC) o anti-sentido (GGGAGAGGAGTTTGTGTGCC), en un volumen total de 10 µl. Las condiciones de la reacción fueron: pre-incubación a 94 °C por 3 minutos, desnaturalización a 96 °C por 30 segundos, alineamiento a 50 °C por 15 segundos y extensión a 60 °C por 4 minutos, por 25 ciclos.

Posteriormente, el DNA se precipitó con isopropanol al 60% y etanol al 70%, se centrifugaron las muestras a 13000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente, se retiró el etanol del tubo y las muestras se colocaron en la Vacufuga (Automatic SpeedVac As160, Savant) por 15 minutos. Una vez obtenida la pastilla seca de DNA plasmídico se adicionaron 20 µl de formamida Hin-Di y las muestras fueron transferidas a la placa de secuenciación. La placa se incubó a 96 °C por 5 minutos y se sumerge en hielo, antes de colocarla en el secuenciador ABI-PRISM 3100 genetic analyzer (Applied Biosystems).

Los fragmentos esperados tienen un tamaño de 493 pb y 354 pb que corresponden al receptor completo (con exón 5) y a la variante, respectivamente.

Por último, se realizó el análisis de secuencias con las herramientas bioinformáticas BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) y SeqBuilder.

9) Ensayos de actividad transcripcional

Se realizaron transfecciones transitorias con las construcciones pcDNA3.1-ER α y ER $\alpha\Delta 5$ en la línea celular MDA-MB 231.

Se sembraron 60 000 células por pozo en medio DMEM suplementado con SFB al 2.5% tratado con carbón activado en placas de 24 pozos, 24 horas antes de la transfección.

Al día siguiente, se prepararon las mezclas de transfección de las construcciones de los receptores, los reporteros de luciferasa (posee dos elementos de respuesta a estrógenos, río arriba del promotor de tirosina cinasa, 2XERE-TkLuc) y β -galactosidasa para seis pozos en 150 µl de medio sin suplemento, como se muestra en la tabla 2.

Tabla 2. Condiciones de transfección de los receptores y reporteros por pozo.

<i>Vector</i>	<i>Concentración de DNA (ng/μl)</i>			
	1:0	0:1	1:1	1:0.4
pcDNA3.1-ERα	50	-	50	50
pcDNA3.1-ERαΔ5	-	50	50	20
2XERE-TkLuc	200	200	200	200
β-galactosidasa	10	10	10	10

En tubos eppendorf, se diluyeron 4 μl de lipofectamine en 150 μl de DMEM sin rojo fenol y sin suplemento, y se incubaron por 5 minutos.

Se mezclaron los mix de DNA y lipofectamine y se incubaron por 30 minutos, para permitir la formación de los complejos DNA-lipofectamine. Posteriormente, se adicionaron 50 μl de la mezcla de transfección a cada pozo.

Las células con los complejos de transfección se incubaron por 4 horas bajo las mismas condiciones de cultivo. Al término, se reemplazó el medio por DMEM sin rojo fenol suplementado con SFB tratado con carbón activado al 2.5% y los pozos correspondientes se incubaron con 17β-estradiol 100 nM (Sigma, E8875) por 48 horas.

Ensayos de Luciferasa.

- Después del tratamiento hormonal, se aspiró el medio de los pozos.
- Se adicionaron 50 μl de buffer de lisis (buffer de potasio 100 mM, pH 7.8 y Triton 100-X al 0.2%) en los pozos y se incubaron a temperatura ambiente por 5 minutos.
- Los lisados celulares se colectaron en tubos eppendorf de 1.5 mL, que fueron centrifugados a 14,000 rpm por 2 minutos.
- En tubos para luminómetro se adicionaron 20 μl del lisado, 100 μl de buffer de reacción (Glicil-glicina 25mM a pH7.8, MgCl₂ 15 mM, ATP 5 mM, BSA 0.5 mg/ml) y 60 μl de Luciferin 1 mM.
- La actividad de luciferasa en las muestras fue detectada en un equipo GLOMAX 20/20 Luminometer (Promega) durante 20 segundos.

Ensayo de β -Galactosidasa.

- Se adicionaron 10 μ l de lisado celular y 100 μ l del buffer de reacción (buffer de fosfatos de sodio 100 mM, pH 8 y Galactón 1X (Applied Biosystems)) en tubos para luminómetro.
- Después, las muestras se incubaron por una hora en oscuridad.
- El luminómetro GLOMAX 20/20 se ajustó para leer durante 5 segundos cada tubo.
- Al término de la incubación, se adicionaron 100 μ l del buffer acelerador TROPIX (Applied Biosystems) y se midió la emisión de luz por 5 segundos.

Análisis estadístico

Los datos se analizaron en el programa ORIGIN® 9.0 Graphing and Analysis (OriginLab). Las unidades relativas de luz (RLU) de luciferasa fueron normalizadas con las de β -galactosidasa, al dividir RLU de luciferasa entre el RLU de β -Galactosidasa. Los datos fueron expresados como actividad normalizada de luciferasa y la media \pm la desviación estándar de tres experimentos con tres muestras por grupo. Para determinar si la isoforma afecta el funcionamiento del receptor alfa, los valores de actividad de las células transfectadas con la isoforma y cotransfectadas ER α :ER α Δ 5 fueron comparadas con los cultivos que expresaron únicamente el receptor completo con tratamiento hormonal y sin tratamiento, según corresponda.

VII. RESULTADOS

1. Caracterización de las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB 231 con base a la expresión de ER α y $\Delta 5$.

Para evaluar la relevancia biológica de la expresión de la variante ER $\alpha\Delta 5$ en ensayos *in vitro*, se seleccionaron líneas celulares de cáncer de mama con fenotipo ER-positivo y negativo. Las células MCF-7 mantienen la expresión de ER α y de varios transcritos generados por *splicing* alternativo, incluida la variante $\Delta 5$ ⁵⁰. Por el contrario, las células MDA-MB231 carecen de la expresión de estos transcritos.

Para corroborar las características de cada línea celular se analizó la expresión de los mRNA de ER α y ER $\alpha\Delta 5$, y su respuesta al tratamiento antiestrógeno.

Se confirmó la expresión de los receptores alfa y $\Delta 5$ en las células MCF-7 y la ausencia de estos en células MDA-MB 231 por medio de reacciones de RT-PCR. La amplificación del fragmento de 439 pb corresponde al transcrito completo, mientras que el fragmento de 300 pb a la variante del receptor de estrógenos (Figura 8).

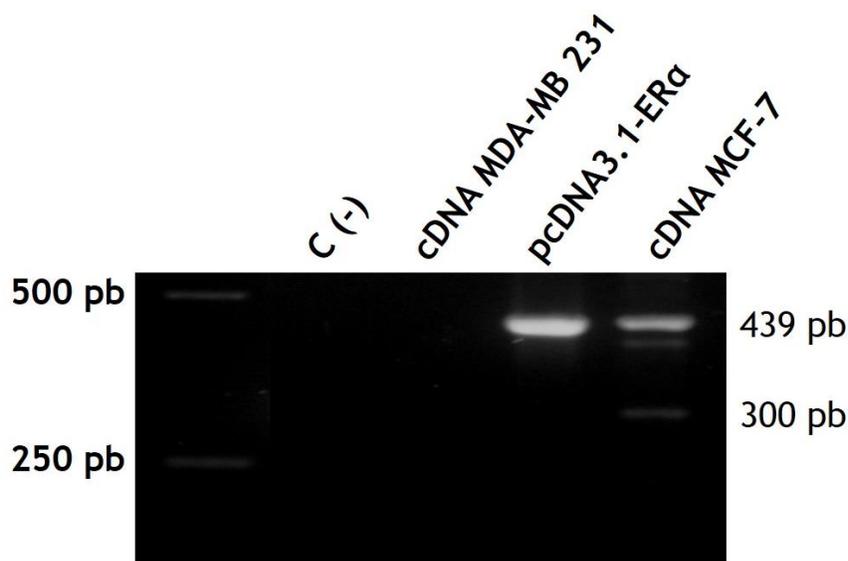


Figura 8. Las células MCF-7 expresan los transcritos ER α y $\Delta 5$. Las células clasificadas ER+, expresan el transcrito completo (439 pb) y la isoforma $\Delta 5$ (300) del receptor de estrógenos alfa. Por el contrario, las células MDA-MB 231 no expresan ninguno de los dos. Adicionalmente, se amplificó el plásmido pCDNA3.1-ER α como control positivo de reacción y como negativo, C(-), se utilizó una muestra de RNA sin RT.

Después de confirmar la expresión o ausencia de los receptores de interés en las líneas de cáncer de mama, se examinó la respuesta al tratamiento con estradiol, tamoxifen, fulvestrant y/o doxorrubicina por el método de MTT.

En MCF-7 se obtuvieron valores de viabilidad de 65% y 48% después del tratamiento con tamoxifen y fulvestrant, respectivamente (Figura 9). Al parecer el efecto antiestrogénico es mayor con fulvestrant comparado con el tamoxifen. Como se esperaba, en los cultivos con estradiol, utilizados como control positivo de viabilidad, se observa el incremento del 21% como efecto producido por la hormona, con respecto a los controles en medio DMEM y DMSO.

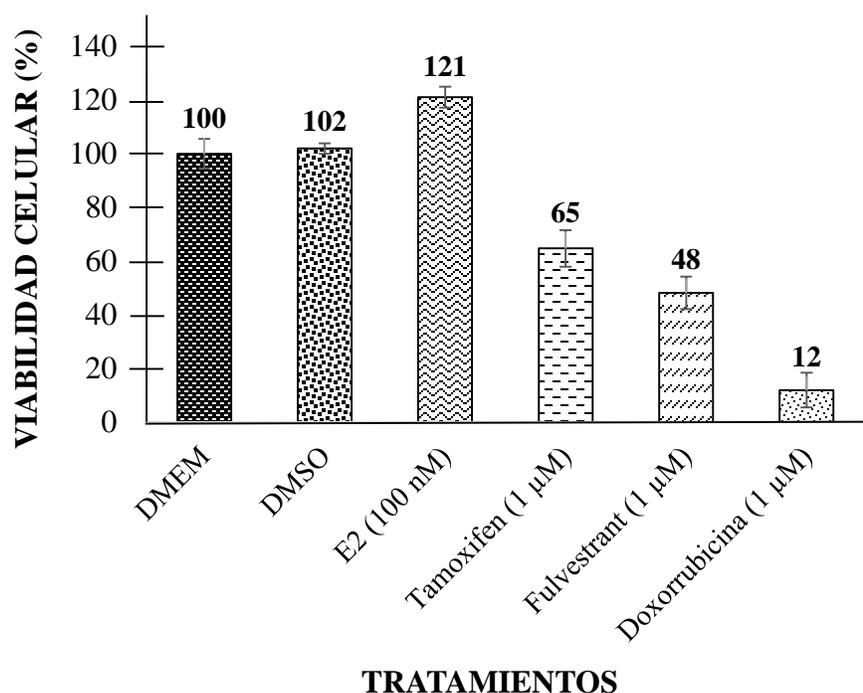


Figura 9. La viabilidad de las células MCF-7 es afectada por el tratamiento hormonal y antiestrogénico. El estradiol (E2) promueve el incremento en la viabilidad de las células ER+. Por el contrario, el tamoxifen y fulvestrant, provocan que la viabilidad disminuya al 65% y 48%, respectivamente, con respecto a los cultivos sin tratamiento (DMEM) y con DMSO. La diferencia en la viabilidad de los distintos tratamientos pertenece a la comparación con el control de DMSO. El análisis estadístico se realizó en el programa ORIGIN® 9.0 Graphing and Analysis (OriginLab) y corresponde a los porcentajes de viabilidad mostrados en cada barra corresponden al promedio de tres ensayos independientes, cada uno con siete replicas por tratamiento ($\bar{X} \pm E.E$).

Por el contrario, la viabilidad de los cultivos de la línea MDA-MB 231 no es afectada por el tratamiento antiestrogénico (Figura 10). Excepto en aquellos tratados con Doxorrubicina, que

en similitud con MCF-7, se observa que el porcentaje de viabilidad es mucho menor que los observados con anti-estrógenos. La Doxorubicina la empleamos como control de muerte celular para asegurar que la carencia de efecto antiestrogénico de la línea que no tiene ER (MDA-MB 231) no se debe a resistencia endócrina a quimioterapéuticos en general sino solo al tratamiento de interés.

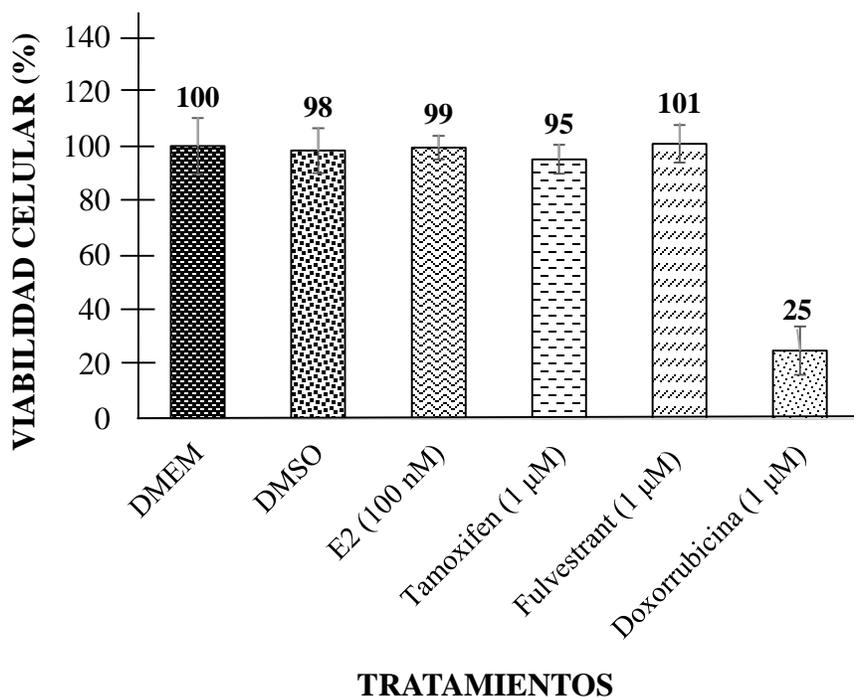


Figura 10. La viabilidad de las células MDA-MB 231 no es afectada por el tratamiento hormonal y antiestrogénico. Las células MDA-MB 231 no expresan el receptor de estrógenos alfa y sus diferentes isoformas, por lo tanto no son sensibles al estradiol y a los antiestrógenos utilizados en el tratamiento de CM. El análisis estadístico se realizó en el programa ORIGIN® 9.0 Graphing and Analysis (OriginLab) y corresponde a los porcentajes de viabilidad mostrados en cada barra corresponden al promedio de tres ensayos independientes, cada uno con siete replicas por tratamiento ($X \pm E.E$).

Posteriormente, los valores de viabilidad obtenidos fueron utilizados como referencia en los ensayos de las células transfectadas con la variante $\Delta 5$.

2. Obtención de la Isoforma ER $\alpha\Delta 5$

La isoforma ER $\alpha\Delta 5$ se obtuvo por mutagénesis sitio dirigida. Se diseñaron oligos para insertar el sitio de restricción para la enzima KpnI en los extremos del exón 5, y liberar un fragmento de 139 pb que corresponde al exón 5 (Figura 11A). Para confirmar la inserción de los sitios de corte se realizó la digestión enzimática con KpnI, obteniéndose fragmentos de

1097 pb y 139 pb, que corresponden a la localización de los sitios entre los exones 4-5 y 5-6, respectivamente. Además, se realizó la doble digestión con EcoRI y KpnI para confirmar las inserciones, liberándose fragmentos de 691 y 552 pb (Figura 11B).

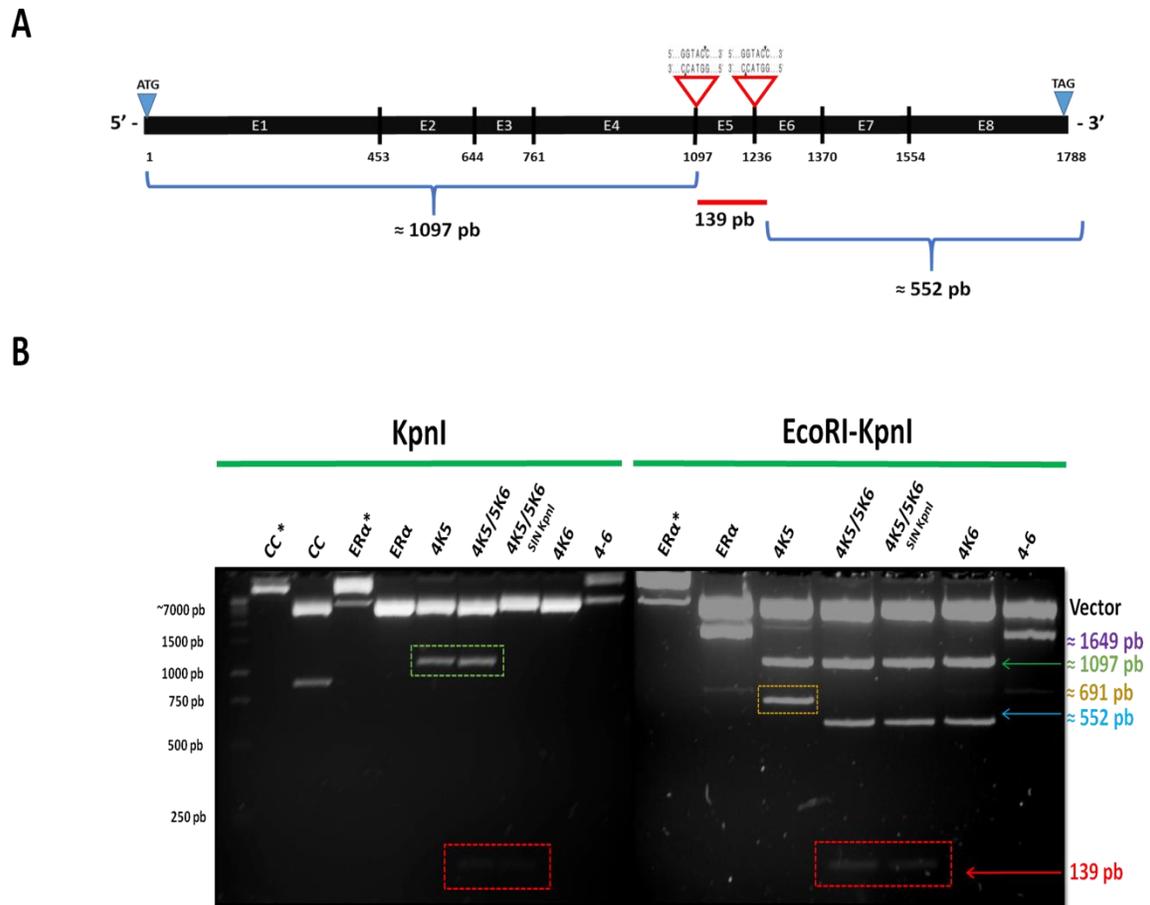


Figura 11. Proceso de obtención de la isoforma ERαΔ5. **A.** Representación esquemática de la obtención de la isoforma ERαΔ5 por mutagénesis sitio dirigida. **B.** Imágenes del corrimiento electroforético de la digestión de pcDNATM3.1(+)-hERα, para obtener la isoforma, con las enzimas KpnI y EcoRI-KpnI, donde se muestran los fragmentos (pb) liberados por el corte. * Vectores sin restricción; CC control de corte de la enzima KpnI.

Por medio del programa informático de alineamiento de secuencias, BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) se analizaron las secuencias de las construcciones pcDNA3.1(+)-hERα y Δ5 (Tabla 3), determinando que la secuencia de la variante no posee nucleótidos correspondientes al exón 5 y/o el sitio de restricción KpnI (Figura 12). El análisis en el software SeqBuilder demostró la formación del codón de paro prematuro por el cambio en el marco de lectura ocasionada por la unión de los exones 4 y 6.

Tabla 3. Secuencias de las construcciones pcDNA3.1(+)-ER α y $\Delta 5$

Vector	Secuencia amplificada (5'-3')
ERα	CTAAGAAGAACAGCCTGGCCTTGTCCTGACGGCCGACCAGATGGTCAGT GCCTTGTTGGATGCTGAGCCCCCATACTCTATTCCGAGTATGATCCTACC AGACCCTTCAGTGAAGCTTCGATGATGGGCTTACTGACCAACCTGGCAGA CAGGGAGCTGGTTCACATGATCAACTGGGCGAAGAGGGTGCCAGGCTTTG TGGATTTGACCCTCCATGATCAGGTCCACCTTCTAGAATGTGCCTGGCTAG AGATCCTGATGATTGGTCTCGTCTGGCGCTCCATGGAGCACCCAGGGAAG CTACTGTTTGCTCCTAACTTGCTCTTGGACAGGAACCAGGGAAAATGTGTA GAGGGCATGGTGGAGATCTTCGACATGCTGCTGGCT
ER$\alpha\Delta 5$	TGATCAAACGCTCTAAGAAGAACAGCCTGGCCTTGTCCTGACGGCCGAC CAGATGGTCAGTGCCTTGTTGGATGCTGAGCCCCCATACTCTATTCCGAG TATGATCCTACCAGACCCTTCAGTGAAGCTTCGATGATGGGCTTACTGACC AACCTGGCAGACAGGGAGCTGGTTCACATGATCAACTGGGCGAAGAGGG TGCCAGGAACCAGGGAAAATGTGTAGAGGGCATGGTGGAGATCTTCGAC ATGCTGCTGGCTACATC

Nota: En la secuencia de ER α se resaltan los nucleótidos, en color gris, pertenecientes al exón 5, y en la secuencia ER $\alpha\Delta 5$ se marca la unión de los exones 4 y 6 (exón 4|exón 6).

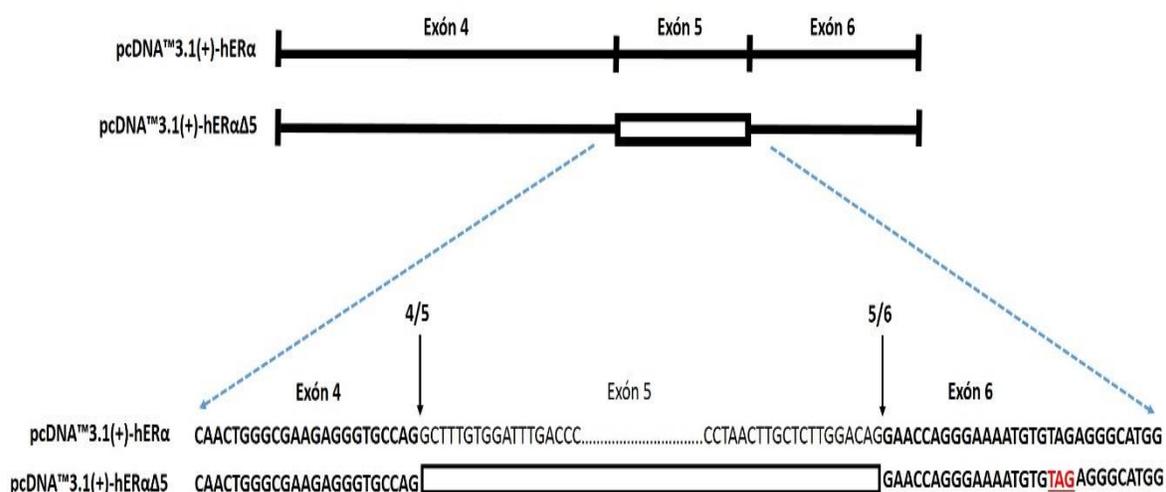


Figura 12. Esquema del análisis de secuencia de ER α y $\Delta 5$. Representación esquemática del alineamiento de la secuencia de ER α (389 pb) con $\Delta 5$ (267 pb), donde se muestra la ausencia de nucleótidos correspondientes al exón 5 y al sitio de restricción KpnI en la secuencia $\Delta 5$ (□). Además, se resalta en color rojo el trinucleótido que dará origen al codón de paro prematuro en el exón 6, por el cambio en el marco de lectura.

3. Actividad transcripcional de la isoforma ER α Δ 5.

La actividad transcripcional del receptor de estrógenos- α es regulada por su ligando, por lo tanto, para evaluar el efecto que tiene Δ 5 sobre el receptor completo se realizaron ensayos de actividad transcripcional *in vitro*. En los ensayos se empleó un gen reportero de luciferasa que posee un promotor tirosina cinasa y dos elementos de respuesta a estrógenos (2XERE-TkLuc).

Los ensayos revelaron que la actividad transcripcional de ER α aumenta tres veces en respuesta al estradiol (100 nM), con respecto a los cultivos sin tratamiento (Figura 13). Estudios anteriores ha reportado que la variante Δ 5, al conservar el sitio AF-1 promueve la transcripción independiente de ligando en algunos tipos celulares. Sin embargo, en nuestro modelo de estudio determinamos que Δ 5 no promueve la transcripción del gen reportero en presencia y ausencia de hormona, ya que los valores de luciferasa detectados en los cultivos que expresaron la variante son similares a los obtenidos en los cultivos que fueron transfectados con el vector vacío pcDNA3.1+ (Figura 13).

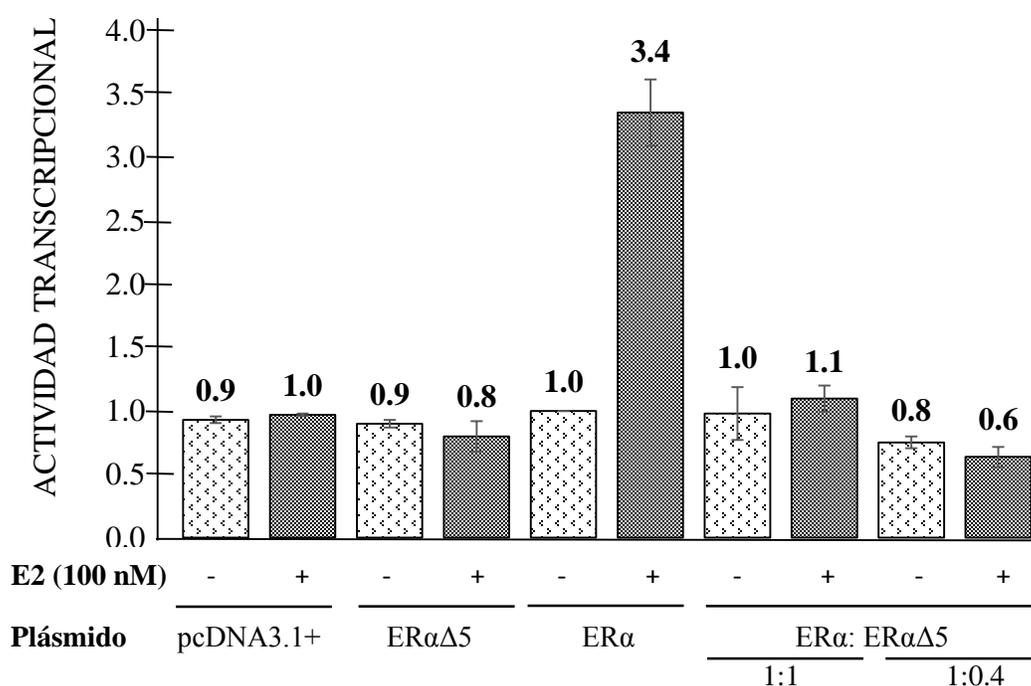


Figura 13. La isoforma Δ 5 disminuye la actividad transcripcional del receptor de estrógenos completo. El receptor alfa en respuesta al estímulo hormonal incrementa tres veces la expresión del gen reportero. Por el contrario, la variante Δ 5 no posee actividad transcripcional. Sin embargo, ejerce un efecto dominante negativo sobre el receptor completo al disminuir significativamente la expresión de luciferasa. El análisis estadístico de los datos se realizó en el programa ORIGIN® 9.0 Graphing and Analysis (OriginLab) y son expresados como actividad normalizada de luciferasa (media \pm la desviación estándar de tres experimentos con tres muestras por grupo). A demás, los valores de actividad de las células transfectadas con la isoforma y cotransfectadas ER α :ER α Δ 5 fueron comparadas con los cultivos que expresaron únicamente el receptor completo.

Además, el receptor $\Delta 5$ disminuye la actividad transcripcional de la proteína completa, hasta el 70%, en presencia y ausencia de estímulo hormonal (Figura 13). Por lo tanto, nuestros datos sugieren que la disminución en la actividad puede deberse a la unión de heterodímeros $ER\alpha:ER\alpha\Delta 5$ u homodímeros $ER\alpha\Delta 5$ a los EREs del gen reportero, que son incapaces de reclutar la maquinaria de transcripción para promover la expresión del gen (Figura 14).

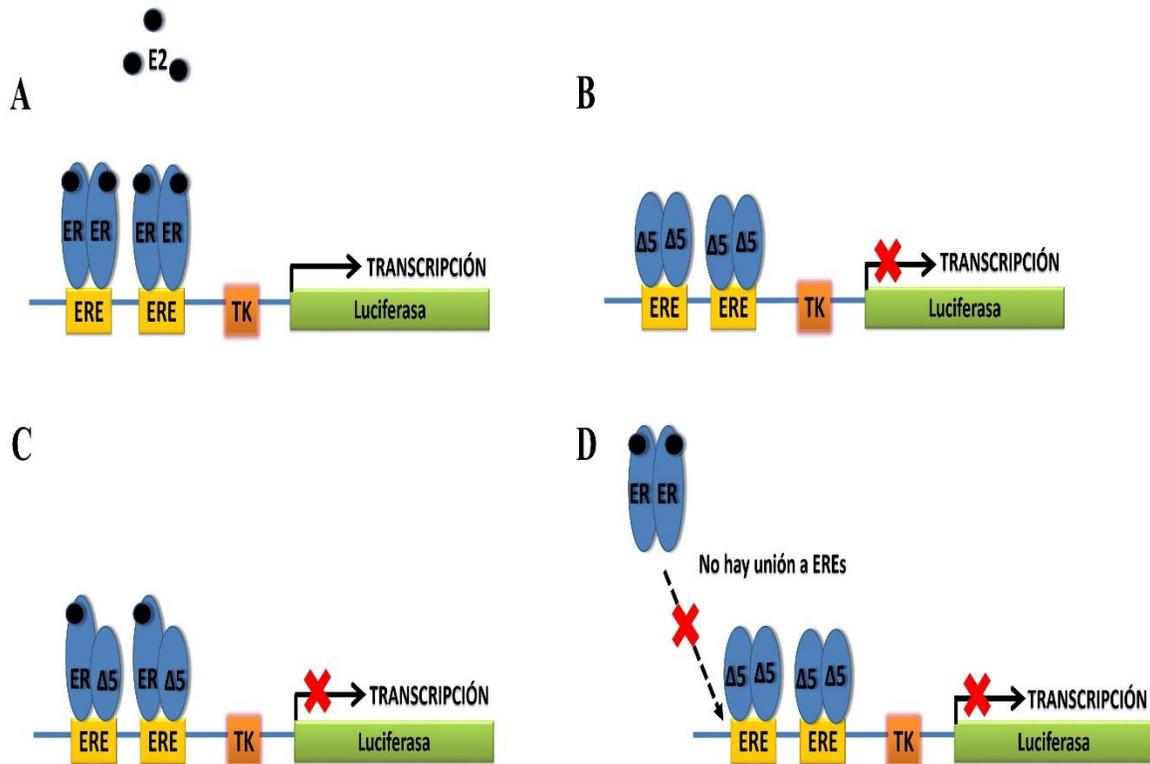


Figura 14. Mecanismo de regulación transcripcional de la variante $\Delta 5$ sobre el receptor de estrógenos alfa ($ER\alpha$). **A.** La unión del ligando, estradiol (E2), al receptor provoca su homodimerización, la subsecuente unión a los EREs, así como el incremento de la transcripción del gen de luciferasa. **B.** Por el contrario, los receptores $\Delta 5$ no promueven la transcripción del gen reportero en presencia y ausencia de ligando. **C.** En co-expresión con $ER\alpha$, se forman heterodímeros ($ER\alpha:\Delta 5$) que son incapaces de reclutar la maquinaria de transcripción. **D.** Por otro lado, la proteína $\Delta 5$ podría bloquear la unión de los homodímeros $ER\alpha$ a sus EREs.

4. DISCUSIÓN

La expresión de ER α ha sido utilizada por muchos años como marcador de pronóstico en cáncer de mama^{35,51}. El tratamiento para esta neoplasia se basa en la inhibición de estímulos mitogénicos provocados por la unión de estrógenos al receptor alfa. El antiestrógeno “tamoxifen”, ampliamente utilizado en el tratamiento de CM, compite con el estradiol por la unión al ER α , a pesar de permitir la dimerización y unión de la proteína a los EREs, altera los patrones de transcripción de los genes, que resulta en la disminución del estímulo mitogénico en la célula^{52,53}. Sin embargo, dos tercios de los tumores de mama son clasificados como ER α -positivos, de los cuales el 50% responden al tratamiento con tamoxifen. Las explicaciones a la falta de respuesta de estos tumores, incluyen la absorción diferencial del fármaco⁵⁴, el microambiente tumoral⁵⁵, metabolismo alterado del tamoxifen⁵⁴ y la expresión de variantes y mutantes del receptor de estrógenos que pueden ser constitutivamente activas en presencia de tamoxifen^{27,31}.

Las variantes de *splicing* del RNA mensajero del ER α son comúnmente expresadas en tejido normal y canceroso, pero son raramente traducidas en proteínas⁵⁶. Entre las variantes identificadas se encuentran: $\Delta 4$ presente en tumores de ovario primario, $\Delta 7$ en tumores cáncer endometrial, y $\Delta 5$ expresada en tejido de mama⁵⁷.

El transcrito $\Delta 5$ fue identificado y caracterizado en tumores con fenotipo ER-/PR+³¹. Además, la variante adquiere importancia fisiológica, al regular la actividad transcripcional de ER α de forma célula-específica; por ejemplo, en células de cáncer de mama MCF-7, transfectadas con $\Delta 5$, la variante no modula la expresión de genes de respuesta a estrógenos como el receptor de progesterona, pero puede promover el crecimiento de las células⁵⁸. En células HeLa, $\Delta 5$ tiene un efecto dominante negativo sobre la estimulación de genes reporteros⁵⁹. La variedad de consecuencias asociadas a la expresión de ER $\alpha\Delta 5$ indican que sus efectos son dependientes del promotor y del contexto celular.

En base a los reportes mencionados y que la variante se expresa muy poco en la línea celular MCF-7 (Figura 8), la isoforma $\Delta 5$ se generó a partir del cDNA de ER α por mutagénesis sitio dirigida (Figura 11), para estudiar el mecanismo de regulación transcripcional que ejerce la variante sobre ER α en un modelo de cáncer de mama. Además, en un futuro se podrá estudiar el papel que desempeña la variante en otros tejidos donde la expresión de algunos genes depende de estrógenos.

Para estudiar la actividad transcripcional individual de $\Delta 5$ y su habilidad para modular la actividad del receptor alfa, se utilizó un reportero de luciferasa que posee dos EREs, en transfecciones transitorias en células ER-negativo, MDA-MB 231. En contraste con lo reportado en células Ishikawa, donde $\Delta 5$ incrementa la expresión basal del reportero⁶⁰, nuestros datos revelaron que la variante posee una actividad basal menor comparada con ER α , en presencia o ausencia de estímulo hormonal, por lo tanto la expresión del gen

reportero promovida por $\Delta 5$ no es modulada por estrógenos. En contraste con lo reportado en células de osteocarcinoma que co-expresan ER α y $\Delta 5$, la variante incrementa la actividad basal y la respuesta a estradiol (E2) del receptor completo ⁶¹, en nuestros resultados de co-transfecciones 1:0.4 y 1:1 de los receptores alfa y $\Delta 5$, respectivamente, la expresión de $\Delta 5$, reduce significativamente la actividad transcripcional en respuesta al estímulo hormonal. Por lo tanto, en nuestro modelo de estudio, la expresión de isoformas de receptor en las células reduce eficazmente el nivel de homodímeros ER α funcionales disponibles para la activación de la transcripción (Figura 13). Además, los resultados sugieren un mecanismo de regulación en el que existe una fuerte influencia de interacciones proteína-proteína.

El efecto dominante negativo que ejercen algunas variantes de receptores ha sido estudiado en diferentes modelos. Por ejemplo, se ha reportado la existencia de dos isoformas (rTR $\alpha 1$ y rTR $\alpha 2$) del transcrito del receptor de la hormona tiroidea de rata (rTR) generada por *splicing* alternativo. Las dos isoformas son idénticas en su secuencia a excepción de la región del carboxilo-terminal. La proteína rTR $\alpha 2$ es incapaz de unirse a la hormona, pero mantiene la capacidad de unirse al elemento de respuesta a hormona tiroidea tan eficientemente como rTR $\alpha 1$. Se ha demostrado que rTR $\alpha 2$ inhibe la inducción dependiente de hormona de un gen regulado por hormona tiroidea por competencia directa por la unión al DNA o por la formación de heterodímeros ^{62,63}. Los mecanismos de inhibición que desempeña el receptor $\Delta 5$ sobre ER α , podrían ser los mismos que ejerce el receptor rTR $\alpha 2$ sobre rTR.

Las modificaciones post-traduccionales de los receptores hormonales esteroides (SR), incluyendo la fosforilación, ubiquitinación, acetilación y sumoilación regulan su expresión y función ⁶⁴⁻⁶⁷. El notable número de sitios de fosforilación en estos receptores y la amplia variedad de quinasas han demostrado que la modulación de la fosforilación influye en la integración entre las vías de señalización celular y la acción de SR. Numerosas funciones asociadas a la fosforilación sito-específica se han dilucidado, incluyendo la sensibilidad a la respuesta hormonal, la unión al DNA, expresión, estabilidad, localización sub-celular, dimerización e interacciones proteína-proteína que pueden determinar la regulación de genes ⁶⁸⁻⁷⁰. Esto sugiere que la fosforilación de ciertos residuos localizados en la región amino terminal, podrían ser importantes para el efecto de los factores de crecimiento sobre $\Delta 5$, como se ha reportado previamente para ER α ⁶⁰.

La modulación de la actividad de ER α por la variante $\Delta 5$ adquiere importancia debido a que la expresión diferencial de la proteína truncada podría tener implicaciones fisiológicas relevantes en las células de mama que la expresen. Actualmente, las consecuencias de su expresión no se conocen, pero se infiere que si la variante confiere una ventaja selectiva durante la progresión del tumor, las células que sobre-expresan esta isoforma podrían predominar y resultar en un fenotipo más agresivo ya que los tumores podrían ser menos sensibles a los tratamientos anti-hormonales.

En base a lo anterior sería relevante evaluar la expresión de variantes del ER α en los métodos clínicos usados para determinar el fenotipo del tumor y de esta forma establecer mejores esquemas de tratamiento para las pacientes con cáncer de mama.

5. CONCLUSIONES

- Se confirmó que las células MCF-7 expresan el transcrito del receptor de estrógenos alfa y de la isoforma $\Delta 5$, y la línea celular MDA-MB 231 posee un fenotipo ER-negativo.
- Se corroboró que las células MCF-7 son sensibles al tratamiento con antiestrógenos. Por el contrario, la viabilidad de las células MDA-MB 231 no se ve afectada por el tratamiento.
- La actividad transcripcional del receptor de estrógenos alfa aumenta tres veces en respuesta al tratamiento hormonal en células MDA-MB 231, que lo expresan transitoriamente.
- El receptor $\Delta 5$ no posee actividad transcripcional AF-1 en nuestro modelo de estudio. Sin embargo, los resultados obtenidos representan un mecanismo de regulación transcripcional mediada por la interacción proteína-proteína, donde ER $\alpha\Delta 5$ ejerce un efecto dominante negativo sobre la actividad del receptor completo.
- El uso de la isoforma $\Delta 5$ será de gran utilidad para continuar con el estudio de la actividad de ER α en otros tipos celulares donde la expresión génica es mediada por estrógenos.

IX. REFERENCIAS

1. Rodríguez Cuevas, S. A. & Capurso García, M. Artículo de revisión Epidemiología del cáncer de mama. *Ginecol Obs. Mex* **74**, 585–593 (2006).
2. Knaul, F. M. *et al.* Cáncer de mama en México : una prioridad apremiante *. *Salud Publica Mex.* **51**, 335–344 (2009).
3. Marchina, E. *et al.* BRCA1 and BRCA2 genetic test in high risk patients and families : Counselling and management. *Oncol. Rep.* **24**, 1661–1667 (2010).
4. Martin, A.-M. & Weber, B. L. Genetic and hormonal risk factors in breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **92**, 1126–35 (2000).
5. Singletary, S. E. Rating the risk factors for breast cancer. *Ann. Surg.* **237**, 474–82 (2003).
6. Bernstein, L. Epidemiology of endocrine-related risk factors for breast cancer. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* **7**, 3–15 (2002).
7. Turner, R. T., Rickard, D. J., Iwaniec, U. T. & Spelsberg, T. C. in *Princ. Bone Biol. Two-Volume Set* **1**, 855–885 (2008).
8. Shao, W. & Brown, M. Advances in estrogen receptor biology: prospects for improvements in targeted breast cancer therapy. *Breast Cancer Res.* **6**, 39–52 (2004).
9. Björnström, L. & Sjöberg, M. Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes. *Mol. Endocrinol.* **19**, 833–42 (2005).
10. Deroo, B. J. & Korach, K. S. Review series estrogen receptors and human disease. *J. Clin. Invest.* **116**, 561–570 (2006).
11. Herynk, M. H. & Fuqua, S. a W. Estrogen receptor mutations in human disease. *Endocr. Rev.* **25**, 869–98 (2004).
12. Kos, M., Reid, G., Denger, S. & Gannon, F. Minireview: genomic organization of the human ERalpha gene promoter region. *Mol. Endocrinol.* **15**, 2057–63 (2001).
13. Green, S., Kumar, V., Krust, A., Walter, P. & Chambon, P. Structural and functional domains of the estrogen receptor. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **51 Pt 2**, 751–8 (1986).
14. Klinge, C. M. Estrogen receptor interaction with co-activators and co-repressors. *Steroids* **65**, 227–51 (2000).

15. Kumar, V. *et al.* Functional domains of the human estrogen receptor. *Cell* **51**, 941–51 (1987).
16. Herynk, M. H. & Fuqua, S. A. W. Estrogen receptor mutations in human disease. *Endocr. Rev.* **25**, 869–898 (2004).
17. Jazaeri, O., Shupnik, M. A., Jazaeri, A. A. & Rice, L. W. Expression of estrogen receptor alpha mRNA and protein variants in human endometrial carcinoma. *Gynecol. Oncol.* **74**, 38–47 (1999).
18. Fuqua, S. A. W. & Wolf, D. M. Molecular aspects of estrogen receptor variants in breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* **35**, 233–41 (1995).
19. Ignar-Trowbridge, D. M., Pimentel, M., Parker, M. G., McLachlan, J. A. & Korach, K. S. Peptide growth factor cross-talk with the estrogen receptor requires the A/B domain and occurs independently of protein kinase C or estradiol. *Endocrinology* **137**, 1735–1744 (1996).
20. Madsen, M. W., Reiter, B. E. & Larsen, S. S. Estrogen receptor messenger RNA splice variants are not involved in antiestrogen resistance in sublines of MCF-7 human breast cancer cells. *Cancer Res.* **57**, 585–589 (1997).
21. Horvarh, G., Leser, G., Hahlin, M. & Henriksson, M. Exon deletions and variants of human estrogen receptor mRNA in endometrial hyperplasia and adenocarcinoma. *Int. J. Gynecol. Cancer* **10**, 128–136 (2000).
22. Leygue, E., Huang, A., Murphy, L. C. & Watson, P. H. Prevalence of estrogen receptor variant messenger RNAs in human breast cancer. *Cancer Res.* **56**, 4324–4327 (1996).
23. Kassi, E. N., Vlachoyiannopoulos, P. G., Moutsopoulos, H. M., Sekeris, C. E. & Moutsatsou, P. Molecular analysis of estrogen receptor alpha and beta in lupus patients. *Eur. J. Clin. Invest.* **31**, 86–93 (2001).
24. Wang, Y. & Miksicek, R. J. Identification of a dominant negative form of the human estrogen receptor. *Mol. Endocrinol.* **5**, 1707–15 (1991).
25. Erenburg, I., Schachter, B., Mira y Lopez, R. & Ossowski, L. Loss of an estrogen receptor isoform (ER alpha delta 3) in breast cancer and the consequences of its reexpression: interference with estrogen-stimulated properties of malignant transformation. *Mol. Endocrinol.* **11**, 2004–15 (1997).
26. Koehorst, S. G. *et al.* Functional analysis of an alternatively spliced estrogen receptor lacking exon 4 isolated from MCF-7 breast cancer cells and meningioma tissue. *Mol. Cell. Endocrinol.* **101**, 237–45 (1994).

27. Fuqua, S. A. W. *et al.* Inhibition of estrogen receptor action by a naturally occurring variant in human breast tumors. *Cancer Res.* **52**, 483–486 (1992).
28. García Pedrero, J. M., Zuazua, P., Martínez-Campa, C., Lazo, P. S. & Ramos, S. The naturally occurring variant of estrogen receptor (ER) ERDeltaE7 suppresses estrogen-dependent transcriptional activation by both wild-type ERalpha and ERbeta. *Endocrinology* **144**, 2967–76 (2003).
29. Pink, J. J., Wu, S.-Q., Wolf, D. M., Bilimoria, M. M. & Jordan, V. C. A novel 80 kDa human estrogen receptor containing a duplication of exons 6 and 7. *Nucleic Acids Res.* **24**, 962–9 (1996).
30. Murphy, L. C. & Dotzlaw, H. Variant estrogen receptor mRNA species detected in human breast cancer biopsy samples. *Mol. Endocrinol.* **3**, 687–93 (1989).
31. Fuqua, S. A. W. *et al.* Variant human breast tumor estrogen receptor with constitutive transcriptional activity. *Cancer Res.* **51**, 105–109 (1991).
32. Castles, C. G. *et al.* Expression of a constitutively active estrogen receptor variant in the estrogen receptor-negative BT-20 human breast cancer cell line. *Cancer Res.* **53**, 5934–5939 (1993).
33. Zhang, Q., Borg, Å. & Fuqua, S. A. W. An exon 5 deletion variant of the estrogen receptor frequently coexpressed with wild-type estrogen receptor in human breast cancer. *Cancer Res.* **53**, 5882–5884 (1993).
34. Daffada, A. A. I. *et al.* Exon 5 deletion variant estrogen receptor messenger RNA expression in relation to tamoxifen resistance and progesterone receptor/pS2 status in human breast cancer. *Cancer Res.* **55**, 288–293 (1995).
35. Allred, D. C. Issues and updates: evaluating estrogen receptor-alpha, progesterone receptor, and HER2 in breast cancer. *Mod. Pathol.* **23 Suppl 2**, S52–9 (2010).
36. Bauer, K., Parise, C. & Caggiano, V. Use of ER/PR/HER2 subtypes in conjunction with the 2007 St Gallen Consensus Statement for early breast cancer. *BMC Cancer* **10**, 228 (2010).
37. Carlson, R. W. The history and mechanism of action of fulvestrant. *Clin. Breast Cancer* **6**, S5–S8 (2005).
38. Murphy, S., Parker, J. & Craig, V. Structure-Activity Derivatives of Tamoxifen : Importance of Hydroxyl Group and Side Chain Positioning for Biological Activity. *Mol. Pharmacol.* **39**, 421–428 (1991).
39. Jordan, V. C. The secrets of selective estrogen receptor modulation: Cell-specific coregulation. *Cancer Cell* **1**, 215–217 (2002).

40. MacGregor, J. I. & Jordan, V. C. Basic guide to the mechanisms of antiestrogen action. *Pharmacol. Rev.* **50**, 151–96 (1998).
41. Osborne, C. K. TAMOXIFEN IN THE TREATMENT OF BREAST CANCER. *N. Engl. J. Med.* **339**, 1609–1618 (1998).
42. Breast Early Trialists Cancer Group Collaborative. Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet* **365**, 1687–717 (2005).
43. Wakeling, A. E., Dukes, M. & Bowler, J. A potent specific pure antiestrogen with clinical potential. *Cancer Res.* **51**, 3867–3873 (1991).
44. Yeh, W.-L. *et al.* Fulvestrant-induced cell death and proteasomal degradation of estrogen receptor α protein in MCF-7 cells require the CSK c-Src tyrosine kinase. *PLoS One* **8**, e60889 (2013).
45. Osborne, C. K., Wakeling, A. & Nicholson, R. I. Fulvestrant: an oestrogen receptor antagonist with a novel mechanism of action. *Br. J. Cancer* **90 Suppl 1**, S2–6 (2004).
46. Inoue, A. *et al.* Development of cDNA microarray for expression profiling of estrogen-responsive genes. *J. Mol. Endocrinol.* **29**, 175–92 (2002).
47. DeFriend, D. J. *et al.* Investigation of a new pure antiestrogen (ICI 182780) in women with primary breast cancer. *Cancer Res.* **54**, 408–414 (1994).
48. Robertson, J. F. *et al.* Comparison of the short-term biological effects of 7 α -[9-(4,4,5,5,5-pentafluoropentylsulfinyl)-nonyl]estra-1,3,5, (10)-triene-3,17 β -diol (Faslodex) versus Tamoxifen in Postmenopausal Women with Primary Breast Cancer. *Cancer Res.* **61**, 6739–6746 (2001).
49. Platet, N., Cathiard, A. M., Gleizes, M. & Garcia, M. Estrogens and their receptors in breast cancer progression: a dual role in cancer proliferation and invasion. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **51**, 55–67 (2004).
50. Pfeffer, U., Fecarotta, E. & Vidali, G. Coexpression of Multiple Estrogen Receptor Variant Messenger RNAs in Normal and Neoplastic Breast Tissues and in MCF-7 Cells. *Cancer Res.* **55**, 2158–2165 (1995).
51. Perou, C. M. *et al.* Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* **406**, 747–52 (2000).
52. Pham, T. a *et al.* Antiestrogen can establish nonproductive receptor complexes and alter chromatin structure at target enhancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**, 3125–9 (1991).

53. Allan, G. F. *et al.* Hormone and antihormone induce distinct conformational changes which are central to steroid receptor activation. *J. Biol. Chem.* **267**, 19513–20 (1992).
54. Lykkesfeldt, A. E. Mechanisms of tamoxifen resistance in the treatment of advanced breast cancer. *Acta Oncol. (Madr)*. **35**, 9–14 (1996).
55. Martinez-Outschoorn, U. E. *et al.* Anti-estrogen resistance in breast cancer is induced by the tumor microenvironment and can be overcome by inhibiting mitochondrial function in epithelial cancer cells. *Cancer Biol. Ther.* **12**, 924–938 (2011).
56. Yang, J., Liu, A., Chiou, S. K., Guzman, R. & Nandi, S. Estrogen receptor variants are present in many normal human tissues. *Int. J. Mol. Med.* **5**, 223–227 (2000).
57. Zhang, Q.-X., Hilsenbeck, S. G., Fuqua, S. A. W. & Borg, A. Multiple splicing variants of the estrogen receptor are present in individual human breast tumors. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **59**, 251–60 (1996).
58. Rea, D. & Parker, M. G. Effects of an exon 5 variant of the estrogen receptor in MCF-7 breast cancer cells. *Cancer Res.* **56**, 1556–1563 (1996).
59. Bollig, a & Miksicek, R. J. An estrogen receptor-alpha splicing variant mediates both positive and negative effects on gene transcription. *Mol. Endocrinol.* **14**, 634–49 (2000).
60. Bryant, W., Snowwhite, A. E., Rice, L. W. & Shupnik, M. a. The estrogen receptor (ER)alpha variant Delta5 exhibits dominant positive activity on ER-regulated promoters in endometrial carcinoma cells. *Endocrinology* **146**, 751–9 (2005).
61. Chaidarun, S. S. & Alexander, J. M. A tumor-specific truncated estrogen receptor splice variant enhances estrogen-stimulated gene expression. *Mol. Endocrinol.* **12**, 1355–1366 (1998).
62. Mitsuhashi, T., Tennyson, G. E. & Nikodem, V. M. Alternative splicing generates messages encoding rat c-erbA proteins that do. *Biochemistry* **85**, 5804–5808 (1988).
63. Izumo, S. & Mahdavi, V. Thyroid hormone receptor alpha isoforms generated by alternative splicing differentially activate myosin HC gene transcription. *Nature* **334**, 539–542 (1988).
64. Lannigan, D. A. Estrogen receptor phosphorylation. *Steroids* **68**, 1–9 (2003).
65. Rajbhandari, P. *et al.* Pin1 modulates ER α levels in breast cancer through inhibition of phosphorylation-dependent ubiquitination and degradation. *Oncogene* **33**, 1438–47 (2014).

66. Ma, Y. *et al.* BRCA1 regulates acetylation and ubiquitination of estrogen receptor-alpha. *Mol. Endocrinol.* **24**, 76–90 (2010).
67. Sentis, S., Le Romancer, M., Bianchin, C., Rostan, M.-C. & Corbo, L. Sumoylation of the estrogen receptor alpha hinge region regulates its transcriptional activity. *Mol. Endocrinol.* **19**, 2671–2684 (2005).
68. Wang, C. *et al.* Direct acetylation of the estrogen receptor alpha hinge region by p300 regulates transactivation and hormone sensitivity. *J. Biol. Chem.* **276**, 18375–83 (2001).
69. Kim, M. Y. *et al.* Acetylation of Estrogen Receptor Alpha by p300 at Lysines 266 and 268 Enhances the DNA Binding and Transactivation Activities of the Receptor. *Mol. Endocrinol.* **20**, 1479–1493 (2006).
70. Chen, D., Pace, P. E., Coombes, R. C. & Ali, S. Phosphorylation of human estrogen receptor alpha by protein kinase A regulates dimerization. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 1002–15 (1999).

ANEXO I

1.1 *Descongelación de las líneas celulares congeladas.*

- Por cada línea celular se tomó un criotubo del congelador a -70°C , se transfirió rápidamente a un baño de agua a 37°C y se agito suavemente hasta que el contenido se descongeló totalmente.
- Se adicionó el contenido del criotubo en una placa p100 con 8 mL de medio DMEM-F12 suplementado con suero fetal bovino (FBS), para cada línea celular.
- Después se adicionaron 4mL de medio de crecimiento, al ya existente en la caja p100, y se agitó suavemente por 30 segundos. Por último, se agregaron 8mL de medio para mantener una relación líquido-gas de 1:8.
- Se rotularon los cultivos con el nombre de la línea celular y fecha.
- Las botellas se incubaron a 37°C en atmósfera de CO_2 al 5% por 4 horas.
- Al término de la incubación, las cajas p100 se observaron al microscopio invertido y se evaluó el porcentaje de viabilidad. Después, se sustituyó el medio con células suspendidas por medio fresco.
- Los cultivos se mantuvieron en incubadoras de CO_2 al 5% a 37°C , hasta que alcanzaron la confluencia del 90%.

1.2 *Subcultivos de las líneas celulares (Técnica de disgregación celular).*

Una vez que se formó la monocapa con una confluencia del 90% en la placa p100, se realizaron los sub-cultivos de la siguiente manera:

- Primero, se succionó el medio de la placa p100 y se adicionó 4mL de PBS para lavar la monocapa y posteriormente se succionó la solución de fosfatos.
- Se agregó 1mL de la solución Tripsina 0.05% - Verseno 0.05% y se dejó actuar hasta que la monocapa empezó a opalescer y desprenderse (5-10min). Para neutralizar la actividad de la enzima se agregaron 3mL de DMEM, bañando la base del recipiente donde crecen las células en cultivo.
- La suspensión celular se transfirió a un tubo falco, y se centrifuga a 1500 rpm por 5 minutos. Se decantó el medio y se suspendió el paquete de células en 5mL de DMEM-F12, se homogenizó la suspensión con una pipeta (evitando hacer burbujas).
- Se distribuyó la suspensión celular en placas de cultivo nuevas y se agregó el volumen de medio necesario para obtener un volumen final de 10mL.

1.3. Congelación de líneas celulares.

- Una vez que se formó la monocapa con una confluencia del 90%, se realizó la técnica de disgregación celular.
- La suspensión celular se centrifugó a 1500 rpm por 5 minutos. Al finalizar, se decantó el medio.
- El paquete celular se diluyó en SFB.
- Se realizaron los cálculos necesarios para preparar una suspensión con dimetilsulfóxido (DMSO) al 10%, tomando en cuenta el número de criotubos y el volumen de estos.
- Se adicionó en cada tubo la suspensión final.
- Los criotubos se colocaron en un REVCO® a -70°C

1.4 Conteo de células y sembrado en placas de 24 y 96 pozos.

Se realizó el conteo celular por el método del hemocitómetro, para sembrar 75000 y 60000 células por pozo en microplacas de 96 y 24 pozos, respectivamente.

- Se limpió perfectamente la parte plateada de la cámara de Neubauer y el cubreobjetos de la misma.
- Una placa de cultivo p100 con una confluencia del 90 al 100%, se trató con tripsina al 0.05% - Verseno 0.05% (técnica de disgregación celular que implica la obtención de la suspensión de células). Se adicionó 3mL de medio y se centrifugó la suspensión a 1500 rpm por 5min.
- Se eliminó el medio y se diluyó el paquete de células en 5mL de DMEM.
- Se tomaron 20 μL de suspensión celular y se diluyeron en 80 μL de azul de tripán (dilución 1:5), se homogenizó y se tomó un volumen suficiente para cubrir las dos cuadrículas del hemocitómetro, se dejó reposar un minuto y se realizó el conteo.
- En cada cuadrícula de la cámara hay 9 cuadros grandes (Figura 10). Se contaron las células vivas (hialinas) presentes en los cuadrantes de las esquinas (L).

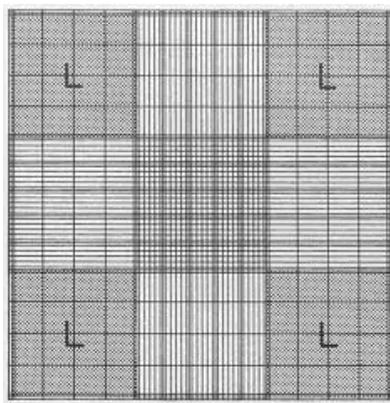


Figura 10. Esquema de los cuadrantes de la cámara de Neubauer. En los cuadrantes de los extremos (L) se realizó el conteo de células.

- Se calculó el número de células por mililitro empleando la siguiente fórmula:

$$C = N \times FC \times FD$$

Donde:

C= Concentración de células por mililitro (Cél/mL)

N= Número de células contadas

FC= Factor de la cámara (10^4)

FD= Factor de dilución.

- Después de calcular el número de células presentes, se realizó otro cálculo para saber que volumen de la suspensión original se debe tomar para sembrar 7500 y 60000 células en placas de 96 y 24 pozos.

1.5 Suero fetal bovino tratado con carbón activado

Para remover la mayor cantidad de hormonas presentes en el suero fetal bovino (SFB), este fue tratado con carbón activado (No. de producto C6241, Sigma) de la siguiente manera:

- Se adiciono 1 g de carbón activado en 49 ml de SFB.
- La mezcla se incubó en agitación por 24 horas a 4°C.
- Al término de la incubación, se removió el carbón activado por centrifugación a 2000 xg por 15 minutos.
- Por último, el SFB fue filtrado (0.22 μ) y almacenado a -20°C