



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**EVALUACIÓN DE LOS PARÁMETROS FARMACODINÁMICOS DE LOS
AMINOESTRÓGENOS PROLAME, BUTOLAME Y PENTOLAME EN LA
PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS MCF-7 DE CARCINOMA MAMARIO HUMANO**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

CARLOS SÁNCHEZ MORÁN

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. FAUSTO ALEJANDRO JIMÉNEZ OROZCO
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM**

**COMITÉ TUTOR: M. EN C. CÁNDIDA MARÍA CRISTINA LEMINI GUZMÁN
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM
DRA. MARÍA ISABEL SOTO CRUZ
FES ZARAGOZA, UNAM**

MÉXICO, D.F. NOVIEMBRE, 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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**EVALUACIÓN DE LOS PARÁMETROS FARMACODINÁMICOS DE LOS
AMINOESTRÓGENOS PROLAME, BUTOLAME Y PENTOLAME EN LA
PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS MCF-7 DE CARCINOMA MAMARIO HUMANO**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

CARLOS SÁNCHEZ MORÁN

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. FAUSTO ALEJANDRO JIMÉNEZ OROZCO
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM**

**COMITÉ TUTOR: M. EN C. CÁNDIDA MARÍA CRISTINA LEMINI GUZMÁN
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM
DRA. MARÍA ISABEL SOTO CRUZ
FES ZARAGOZA, UNAM**

MÉXICO, D.F. NOVIEMBRE, 2014

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 01 de septiembre de 2014, aprobó el jurado para la presentación de su examen para obtener el grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** del alumno **SÁNCHEZ MORÁN CARLOS** con número de cuenta **76414305**, con la tesis titulada **"EVALUACIÓN DE LOS PARÁMETROS FARMACODINÁMICOS DE LOS AMINOESTRÓGENOS PROLAME, BUTOLAME Y PENTOLAME EN LA PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS MCF-7 DE CARCINOMA MAMARIO HUMANO"**, realizada bajo la dirección del **DR. FAUSTO ALEJANDRO JIMÉNEZ OROZCO**:

Presidente: DR. MARCO ANTONIO VELASCO VELÁZQUEZ
Vocal: DR. FERNANDO LARREA GALLO
Secretario: M. EN C. CANDIDA MARÍA CRISTINA LEMINI GUZMÁN
Suplente: DRA. EVA MARÍA MOLINA TRINIDAD
Suplente: DRA. MARÍA ISABEL SOTO CRUZ

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 03 de noviembre de 2014

M. del Coro Arizmendi

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



C.P. AGUSTIN MERCADO
Subdirector de Certificación y Control Documental

AGRADECIMIENTOS

a) Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) por darme la oportunidad de continuar preparándome en esta máxima casa de estudios.

b) Al programa de becas del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico recibido con número de CVU/Becario: 55430/55430.

c) Al comité tutor:

A la M. en C. Cándida Cristina Lemini Guzmán por su apoyo incondicional en el desarrollo de esta tesis y por sus valiosas recomendaciones durante el transcurso del proyecto. Muchas gracias por permitirme participar en su proyecto de investigación para realizar mi tesis.

A la Dra. Isabel Soto Cruz por sus acertadas sugerencias en la revisión de este trabajo.

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

Agradezco primero a Dios por permitirme llegar a este momento y alcanzar esta meta.

A mi tutor Dr. Alejandro Jiménez quien me otorgó la oportunidad de ser su alumno de maestría y por haberme dedicado muchas horas en la dirección de esta tesis. Gracias por haberme orientado, apoyado y corregido en mi labor como estudiante de ciencias biológicas.

Gracias a mis compañeras del Laboratorio que hicieron de mi estancia en este lugar siempre fuera agradable.

Gracias a Juanola García quien con sus consejos y apoyo contribuyó a superar obstáculos en mi camino.

Gracias a Amelia Maldonado por su ayuda y apoyo constante que siempre me resulto de utilidad en situaciones de necesidad.

Gracias a Nerea Benítez que con su trabajo diario de laboratorio me ayudó a realizar mis experimentos sin contratiempos.

Gracias a mi compañera Marion Rodríguez que me apoyó y compartió su experiencia en el laboratorio.

Gracias a Martha Medina que con su ayuda me permitió superar dificultades y alcanzar mis objetivos.

Gracias a María Elena Ávila por el apoyo constante en la realización de mi trabajo, así mismo, le doy las gracias por la revisión y correcciones realizadas a mi tesis que contribuyeron a mejorar su calidad.

Gracias a todos los que me dieron algo de sí mismos dejando huella en mí, mejorando mi vida.

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a la memoria de mis padres que por su apoyo incondicional fue posible llegar a término de este proyecto, lamento muchísimo que en este momento tan especial para mí ya no estén físicamente presentes, pero sé que si lo están espiritualmente.

A mis hermanos y en particular a mi hermana Susy por su apoyo y ayuda en las necesidades del día a día y a mi hermano Alejandro por su apoyo incondicional en momentos oportunos.

Sobre todo, dedico esta tesis a mis hijas Selma y Karla quienes han sido parte muy importante de mi vida.

“Gobierna tu casa y sabrás cuánto cuesta la leña y el arroz, cría a tus hijos y sabrás cuanto debes a tus padres”

Proverbio oriental

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS	i
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	3
1. INTRODUCCION.....	5
1.1 USO DE ESTRÓGENOS.....	6
1.2 RIESGOS DEL USO DE LA TERAPIA DE REEMPLAZO HORMONAL..	6
1.3 LOS AEs Y SUS EFECTOS ESTROGÉNICOS Y ANTICOAGULANTES... 7	
1.4 RELACIÓN ESTRUCTURA-ACTIVIDAD DE LOS AEs CON RESPECTO AL E ₂	8
1.5 TIPOS DE RECEPTORES DE ESTRÓGENOS.....	10
1.6 SUBTIPOS DE RECEPTORES DE ESTRÓGENO CITOSÓLICOS.....	11
1.7 ISOFORMAS DE LOS RECEPTORES DE ESTRÓGENO CITOSÓLICOS.....	12
1.8 PARTICIPACIÓN DE LOS RECEPTORES DE ESTRÓGENO EN LA TRANSCRIPCIÓN (MODELO GENOMICO).....	14
1.9 RECEPTOR METABOTRÓPICO DE ESTRÓGENO O DE MEMBRANA (mER) Y SU PAPEL EN LA TRANSACTIVACIÓN.....	17
1.10 MECANISMOS DE SEÑALIZACIÓN ATRAVES DEL RECEPTOR DE ESTRÓGENO METABOTRÓPICO GPR30	18
1.11 SEÑALIZACIÓN MEDIANTE RECEPTORES CITOSÓLICOS CON RECEPTORES CON ACTIVIDAD TIROSINA CINASA.	19
1.11.1 Vía PI3K/AKT/mTOR.....	19
1.11.2 Vía Raf/MEK/ERK.....	20
1.11.3 Vías de señalización por receptores del factor de crecimiento epidérmico.....	20
1.11.4 Vías de señalización por receptores del factor de crecimiento semejante a insulina (IGF-1R).....	22
2. JUSTIFICACION	23
2.1 HIPÓTESIS.....	23
2.2 OBJETIVOS.....	24
2.2.1 OBJETIVO GENERAL.....	24

2.2.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
3. METODOLOGÍA.....	25
3.1 REACTIVOS	25
3.2 TRATAMIENTO DEL SUERO FETAL BOVINO CON CARBÓN-DEXTRÁN PARA ELIMINAR HORMONAS ESTEROIDES (Stanley et al, 1997).....	25
3.3 TIPOS DE MEDIO Y CONDICIONES DE CULTIVO	26
3.4 LÍNEA CELULAR.....	26
3.5 ENSAYO DE REDUCCIÓN DE MTT (BROMURO DE 3-(4,5- DIMETILTIAZOL-2-IL-2,5-DIFENIL TETRAZOLIO) PARA EVALUAR LA PROLIFERACIÓN CELULAR DE LAS CÉLULAS MCF-7	27
3.6 ESTIMACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN DE LAS CÉLULAS MCF-7	28
3.7 ESTIMACIÓN DE LA EFICACIA PROLIFERATIVA RELATIVA (EPR) Y POTENCIA PROLIFERATIVA RELATIVA (PPR).....	28
3.8 EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LOS COMPUESTOS EN EL CICLO CELULAR DE CÉLULAS MCF-7 POR CITOMETRÍA DE FLUJO.....	29
3.9 EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE CICLINA D1 CÉLULAS MCF-7 ..	30
3.10 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	32
4. RESULTADOS	33
4.1 CURVAS CONCENTRACIÓN-RESPUESTA DE ESTRADIOL Y AMINOESTRÓGENOS.	33
4.2 CONDICIONES ESTROGÉNICAS.....	33
4.3 CONDICIONES NO ESTROGÉNICAS.	35
4.4 COMPARACIÓN DE PARÁMETROS FARMACODINÁMICOS EN LAS DOS CONDICIONES DE CULTIVO.....	37
4.5 ESTANDARIZACIÓN DEL EFECTO DEL E ₂ Y AEs SOBRE LA INDUCCIÓN A LA FASE S DEL CICLO CELULAR.....	38
4.6 EFECTO DEL E ₂ Y AEs SOBRE LA FASE S DEL CICLO CELULAR A 24 Y 48 HORAS DE EXPOSICIÓN.	40
4.7 EFECTO DEL E ₂ Y DE LOS AEs SOBRE LA EXPRESIÓN DE LA CICLINA D1 EN CÉLULAS MCF-7.....	43
5. DISCUSIÓN.....	46
6. CONCLUSIONES	49
7. BIBLIOGRAFÍA.....	51

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Estructura de los 17β -aminoestrógenos y 17β -estradiol.	8
figura 2Diagrama esquemático de los dos subtipos de ERs humanos, ER α y ER β	11
Figura. 3Estructura de dominios de las isoformas del ER- α en células de cáncer de mama MCF7	13
Figura. 4Modelo de rápida señalización iniciada en membrana por el E ₂ a través del ER- α 36	14
Figura 5. Vías canónicas de señalización del E ₂ a través del ER	15
figura 6Estructura del receptor GPR30 acoplado a proteínas Gs con actividad estrogénica	17
Figura 7. Interacción entre las vías de señalización del ER- α y HER	21
Figura 8. Interdependencia entre las vías de señalización del receptor semejante a insulina 1 (IGF-1R) y la del el receptor del estrógeno (ER- α).....	22
Figura 9. Respuesta bifásica observada en las curvas concentración respuesta del E ₂ y AEs bajo condiciones estrogénicas	33
Figura 10. Fase inhibitoria en condiciones estrogénicas de E ₂ y AEs.....	35
Figura 11. Curvas concentración-respuesta del E ₂ y AEs en condiciones no estrogénicas	35
Figura 12. Fase inhibitoria en condiciones no estrogénicas de E ₂ y AEs.....	36
Figura 13. Estandarización de condiciones para la sincronización de células MCF-7 en fase G1	39
Figura 14. Efecto de E ₂ y AEs (10^{-10} M) en la inducción del ciclo celular de células MCF-7 arrestadas en fase G1.....	41
Figura 15. Efecto del E ₂ y los AEs prolame, butolame y pentolame sobre la fase S del ciclo celular en células MCF-7	42
Figura 16. Expresión del gen para ciclina D1 inducida a 3, 6,12 y 24 horas de exposición a E ₂ (10^{-10} M) en condiciones no estrogénicas.	44
Figura 17. Expresión del gen para ciclina D1 inducido a las 6 horas de exposición a E ₂ o a prolame, butolame o pentolame (10^{-10} M).....	45

Tabla I. Secuencia de iniciadores para la amplificación de los genes CCND1 y GAPDH.	31
Tabla II. Componentes de la mezcla de reacción para PCR en tiempo real.	31
Tabla III. Parámetros farmacodinámicos del efecto de los aminoestrógenos sobre la proliferación de células MCF-7 medidas en condiciones estrogénicas.	34
Tabla IV. Parámetros farmacodinámicos del efecto de E ₂ y los AEs sobre la proliferación de células MCF-7 medidas estimadas en condiciones no estrogénicas.	36
Tabla V. Comparación entre condiciones estrogénicas y no estrogénicas.	37
Tabla VI. Porcentaje del efecto proliferativo de E ₂ y los AEs sobre la proliferación de células MCF-7 a las concentraciones de 10 ⁻⁷ M y 10 ⁻⁶ M en condiciones estrogénicas y no estrogénicas.	38
Tabla VII. Efecto del E ₂ y AEs sobre la inducción de la fase S y la estimación de la eficacia proliferativa relativa (EPR) a las 24 y 48 horas de exposición	42

RESUMEN

Los estrógenos tienen importantes efectos estimulantes sobre la proliferación celular, que limitan su uso en poblaciones de mujeres con riesgo de tumores malignos. Por lo que, es importante desarrollar agentes terapéuticos más seguros para la terapia de remplazo hormonal (TRH).

Por sus acciones anticoagulantes, los 17β -aminoestrógenos (AEs) prolame, butolame y pentolame son fármacos prometedores para su inclusión en la TRH. Sin embargo se desconoce su potencial proliferativo en células tumorales dependientes de estrógenos.

Por lo anterior, es necesario evaluar las propiedades estrogénicas de los AEs en la proliferación de células MCF-7 de carcinoma mamario humano, para seleccionar aquel que sea más seguro y con mejor potencial terapéutico.

En este trabajo se evaluó la eficacia y potencia proliferativa de los AEs en relación al estradiol (E_2) en células MCF-7 a través de tres metodologías experimentales: ensayos de MTT, citometría de flujo y PCR en tiempo real.

Tanto en condiciones estrogénicas como no estrogénicas, el E_2 y los AEs mostraron comportamiento bifásico en la proliferación que se observa en las curvas concentración-respuesta. La actividad de los AEs fue similar en las dos condiciones, mientras que la del E_2 fue significativamente mayor en condiciones estrogénicas que en las no estrogénicas.

En las condiciones no estrogénicas hubo menos variabilidad e interacciones que permitió evaluar con mayor precisión los parámetros farmacodinámicos de compuestos similares como es el caso de prolame, butolame y pentolame. Los estudios posteriores se realizaron solamente en condiciones no estrogénicas.

En ensayos de MTT el AE con mayor potencia proliferativa fue el butolame (13%), seguido del prolame (10 %) y finalmente el pentolame (8 %). El butolame también fue el más eficaz (69 %), pero no se observaron diferencias en las eficacias proliferativas relativas de prolame y pentolame (64 y 65 % respectivamente). Por esto, se evaluó la eficacia de los AEs a través de ensayos más específicos a tiempos más cortos.

En los ensayos de citometría de flujo las diferencias observadas entre los grupos tratados alcanzaron significancia estadística con respecto al control. El orden de eficacia para inducir la fase S del ciclo celular fue semejante al obtenido de las potencias proliferativas: butolame>prolame>pentolame.

Estos resultados fueron consistentes con la expresión del gen *CCND1*. Inesperadamente, la respuesta de los AEs fue mayor que la observada con E₂. Por el corto tiempo en que se observa la respuesta, los resultados sugieren que el mayor efecto de los aminoestrógenos en la síntesis de RNA, podría ser consecuencia de acciones no genómicas.

En algunos modelos biológicos, prolame tiene mayores efectos estrogénicos que la butolame y el pentolame sin embargo, en este trabajo, en los tres diferentes tipos de pruebas realizados con la AEs en células MCF-7, el AE más activo y más potente fue el butolame y el menos activo fue el pentolame. Esto sugiere que el pentolame podría ser un compuesto más seguro en mujeres con predisposición a cáncer de mama, por lo que este compuesto podría ser objeto de estudios posteriores.

ABSTRACT

Estrogens have significant stimulatory effects on cell proliferation, therefore, their use is limited for populations of women at risk of malignant tumors, and hence, it is important to develop safer therapeutic agents in the hormone replacement therapy (HRT).

Due to its anticoagulant actions, the 17β -aminoestrogens (AEs) prolame, butolame and pentolame are promising compounds for HRT. However, their proliferative potential in estrogen-dependent tumor cells is unknown.

Therefore, it is necessary to evaluate the estrogenic properties of the AEs to select the safer and with the better therapeutic potential.

In MTT assays, the AE with higher proliferative potency was butolame (13 %), followed by prolame (10 %) and pentolame (8 %), being butolame the most effective (69 %), although very different from the relative proliferative efficacies of prolame and pentolame (64 and 65 % respectively). Therefore, the effectiveness of AEs through more specific assays in shorter times was evaluated.

In the flow cytometry assays the observed differences between the AEs treated groups reached statistical significance with respect to the hormone free control. The order of efficacy to induce the S phase of the cell cycle was similar to that obtained from the proliferative potencies: butolame > prolame > pentolame.

In this work, we evaluated the effectiveness and proliferative potency of these AEs related to estradiol (E_2) on the proliferation of the MCF-7 human mammary carcinoma cells evaluated through three experimental methodologies: MTT cell viability assay, flow cytometry and real-time PCR, both, in estrogenic and non-estrogenic conditions.

E_2 and AEs showed biphasic proliferative behavior in the dose response curves. The activity of the AEs was similar in both conditions, whereas that of the E_2 was significantly higher in the estrogenic conditions than in the non-estrogenic.

Since in these later conditions less variability and interactions occurred, it allowed us to assess more accurately the evaluation of pharmacodynamics parameters of

compounds similar to E2 like are prolame, butolame and pentolame, All further assays were performed in non-estrogenic conditions.

These results were consistent with the expression of the *CCND1* gene. Unexpectedly, the response of the AEs was greater than that observed with E₂. Considering the short time of the response, the results suggest that the major effect of the aminoestrogens in the RNA synthesis could be the result of non-genomic actions.

In some experimental biological models, prolame has greater estrogenic effects than butolame and pentolame however, in this work the three different types of tests conducted with the AEs in MCF-7 cells, the more active and more potent was butolame and the less active was pentolame. This suggests that the pentolame could be safer in women with a predisposition to breast cancer, so this compound could be the subject of further studies.

1. INTRODUCCION

Los estrógenos son hormonas esenciales que regulan el crecimiento, desarrollo y fisiología del sistema reproductivo humano (Swedenborg et al, 2009). También afectan a los sistemas neuroendocrino, esquelético, adiposo y cardiovascular (Hughes et al, 2009, Yang et al, 2010). El 17β -estradiol (E_2) es la principal hormona estrogénica con efectos pleiotrópicos, es decir, producen gran variedad de acciones en distintos tipos de tejidos, (Risbridger et al, 2010).

Como ejemplos, en el sistema óseo, el E_2 es el principal regulador hormonal del metabolismo del hueso en hombres y mujeres. Los efectos directos del E_2 sobre los osteocitos, osteoclastos y osteoblastos conducen a la inhibición de la remodelación del hueso, a la disminución de la reabsorción y al mantenimiento de la formación del hueso respectivamente (Khosla S. et al. 2012) y en el sistema cardiovascular, el E_2 estimula la actividad de la sintasa del óxido nítrico endotelial (eNOS) y provoca la vasodilatación aumentar rápidamente la producción de óxido nítrico (Scott P. et al. 2007).

La menopausia es una condición resultante del agotamiento de la función ovárica seguida por el cese de la menstruación en las mujeres y frecuentemente se presenta alrededor de los 50 años de edad (Gjelsvik B et al, 2011). La dramática disminución en los niveles de estrógeno durante esta etapa produce un desequilibrio endocrino y emocional como es entre otros un estado de ánimo depresivo, irritabilidad y ansiedad, además de agotamiento mental y físico (Winse et al, 2001, Gjelsvik B et al, 2011).

Esta deficiencia estrogénica se asocia con varios síntomas somáticos como, la pérdida de masa ósea, atrofia urogenital, infecciones del tracto urinario, aumento de riesgo cardiovascular, disfunción sexual y pérdida de elasticidad de la piel (Ojeda et al, 2014).

Todos estos síntomas tienen un importante impacto negativo sobre la calidad de vida de la mujer y debido al aumento de la vida media poblacional, es importante desarrollar terapias más eficaces y seguras para su tratamiento.

1.1 USO DE ESTRÓGENOS.

En la Terapia de Reemplazo Hormonal (TRH) que es el tratamiento más común para aliviar los síntomas de la menopausia, se utilizan estrógenos equinos o estrógenos sintéticos combinados con progestágenos (van Hylckama et al, 2011). Los beneficios de la TRH incluyen alivio de los síntomas pre y pos-menopáusicos y retrasan el inicio de la osteoporosis (de Villiers et al, 2013)

Los estrógenos también son ampliamente utilizados como anticonceptivos; se estima que el 9% de las mujeres de todo el mundo los utilizan (Gjelsvik et al, 2011). Por sus efectos adversos, los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades del Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos de Norteamérica recomiendan su uso sólo en mujeres menores de 35 años que no tienen antecedentes de trombosis venosa, de tabaquismo y de migrañas con aura (CDC, 2010).

1.2 RIESGOS DEL USO DE LA TERAPIA DE REEMPLAZO HORMONAL.

La eficacia de la TRH ha sido documentada ampliamente en numerosos estudios clínicos como HERS (Hulley et al, 1998), WHI (Anderson et al, 2004), WAVE (Kelemen et al, 2005), WELL-HART (Steiner et al, 2007), ERAI (Herrington et al, 2000) y WISDOM (Vickers et al, 2007), entre otros. Sin embargo, estos estudios también han puesto en evidencia los efectos adversos de la TRH, como la enfermedad cardiovascular primaria y secundaria, pero sobre todo el incremento de riesgo de tromboembolia venosa (TEV), que ocurre principalmente durante el primer año de uso. Entre los mecanismos responsables de los efectos trombóticos de la TRH se encuentran aumentos en los niveles de factores de coagulación, disminución de los anticoagulantes naturales, niveles alterados de fibrinógeno y resistencia a la proteína C activada (Tchaikovski et al, 2010, Gaussem et al, 2011). Otros factores que influyen en la aparición de los primeros episodios trombóticos durante la TRH son la dosis, la vía de administración, así como polimorfismos genéticos del Leiden V y la protrombina 20210A (Rosendaal et al, 2003).

El metabolismo del E₂ depende de la ruta de administración de la TRH, y esto puede afectar el riesgo de TEV (Margarido P. et al, 2011). En las mujeres que usan TRH por vía oral se aumenta significativamente la generación de trombina, la cual es muy importante en la cascada de coagulación y es responsable de convertir fibrinógeno en fibrina, uno de los estados finales en la formación del coágulo. (Bagot M. et al, 2010).

Con el uso de la TRH oral, se produce la activación de la coagulación (por ejemplo, incremento de los niveles del factor de la coagulación VII, mayores niveles de trombina (Blondon M. et al, 2014) y hay disminución de sustancias anticoagulantes (por ejemplo, antitrombina, proteína C, proteína S, activador del plasminógeno tisular natural [tPA] (Post M. et al, 2003). El uso transdérmico de E₂ no aumenta el riesgo de TEV en comparación con las no usuarias. (Laliberte F. et al, 2011).

Otros efectos adversos más graves de la terapia con estrógenos son particularmente el aumento en la incidencia de cáncer de mama, cáncer de ovario y tumor maligno del endometrio en las usuarias. (Levin et al, 2009). Por lo que es importante desarrollar nuevos agentes farmacológicos que carezcan de efectos trombóticos y tumorales.

1.3 17β-AMINOESTRÓGENOS Y SUS EFECTOS ESTROGÉNICOS Y ANTICOAGULANTES.

Los 17β-aminoestrógenos (AEs) prolame, butolame y pentolame poseen una estructura química esteroide (figura 1) con una cadena lateral amino-alcohol N-(CH₂)_n-OH (n = 3, o 4 o 5 metilenos respectivamente) en el carbono 17β (Lemini et al, 2009, Lemini et al, 2005a, Lemini et al, 2005b, Lemini et al, 1993). A diferencia de los estrógenos de actual uso, estos compuestos producen efectos anticoagulantes importantes en diferentes especies de roedores (Rubio-Póo et al, 1990, Lemini et al, 1993). Estos compuestos podrían constituir una nueva

alternativa para mujeres perimenopáusicas, en especial para aquellas con predisposición a padecer eventos tromboembólicos.

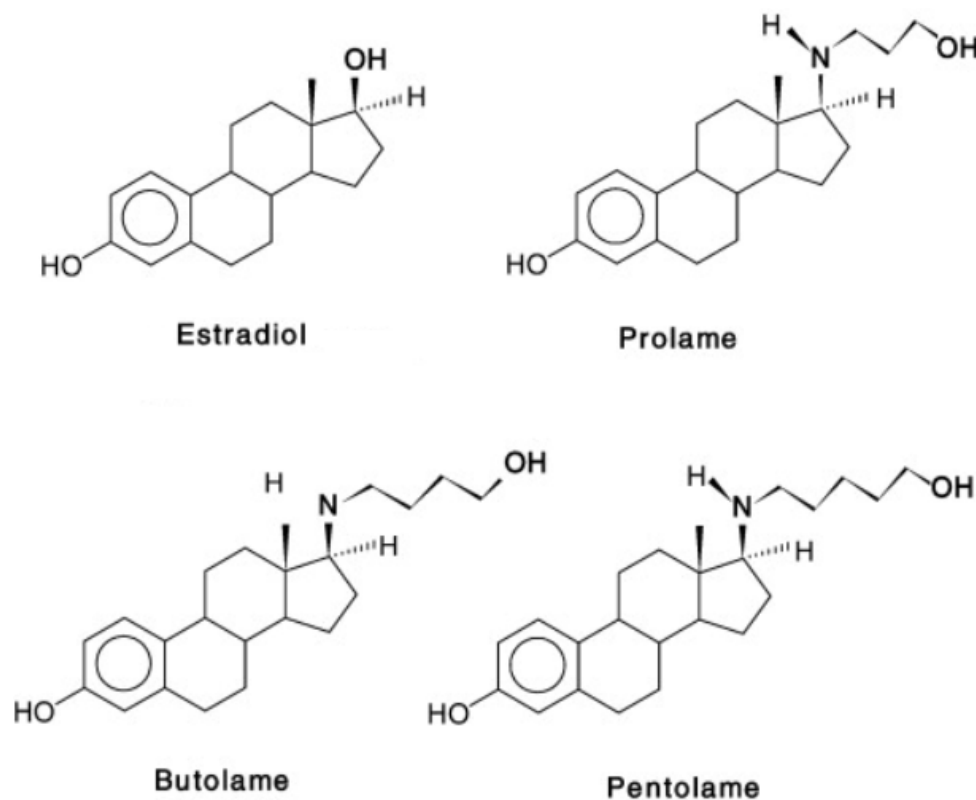


Figura 1. Estructura de los 17β-aminoestrógenos, Prolame [17β-(3-hidroxy-1-propilamino)-1,3,5(10)-estratrien-3-ol], Butolame [17β-(3-hidroxy-1-butilamino)-1,3,5(10)-estratrien-3-ol], Pentolame [17β-(5-hidroxy-1-pentilamino)-1,3,5(10)-estratrien-3-ol] y de Estradiol [17β-estradiol] (Lemini et al, 2009).

1.4 RELACIÓN ESTRUCTURA-ACTIVIDAD DE LOS AEs CON RESPECTO AL E₂.

La prueba uterotrónica es un método para evaluar *in vivo* el potencial estrogénico de compuestos y se basa en el fuerte efecto proliferativo que el E₂ tiene sobre el útero del roedor. Esta prueba se realiza comúnmente con las mediciones del peso útero de los roedores inmaduros u ovariectomizados. (Gweneg K. et al, 2013).

Entre los cambios morfológicos y fisiológicos inducidos en el útero después de la administración de E₂, existe un aumento de imbibición de agua en el endometrio

uterino como resultado de la hiperemia y vasodilatación de capilares uterinos. Este proceso conduce a un aumento de tamaño del útero con una consecuente descompactación significativa de las células del estroma. El agua se mueve del epitelio hacia el lumen, disminuyendo la viscosidad del fluido luminal y un aumento de peso húmedo uterino. (Naciff J. et al, 2007).

La capacidad secretora del útero se incrementa por la estimulación de E₂, debido al desarrollo de la capa de células epiteliales secretoras y mitosis, principalmente en la capa epitelial. Al mismo tiempo, hay un aumento en la vascularización del útero, que aumenta la cantidad de sangre en este órgano (Naciff J. et al, 2007).

También hay un aumento en el número y tamaño de los tipos específicos de células (hipertrofia e hiperplasia), que contribuye al gran aumento de peso uterino que puede ser detectada entre las 16 y 30 h después de la estimulación por E₂ (Naciff J. et al, 2007).

In vivo, los AEs producen efectos uterotróficos que se han evaluado en modelos de rata y ratón, en donde se ha observado que los ratones hembra inmaduras son el modelo más sensible para evaluar el efecto estrogénico de estos compuestos. El orden del efecto uterotrófico en ratones hembra inmaduras fue el siguiente: E₂ > prolame > butolame > pentolame, en tanto que para ratas inmaduras fue E₂ > butolame > prolame > pentolame (Lemini et al, 2005).

La producción de la LH y la FSH por la pituitaria anterior está bajo el control de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) que se produce en el hipotálamo. El E₂ actúa a través del ER- α para inhibir la liberación de LH y FSH en el hipotálamo al ejercer efecto inhibitorio sobre producción de la GnRH (Glidewell-Kenney C. et al, 2008). En ratas ovariectomizadas (Ovx), aumenta el nivel sérico de la LH y el tratamiento con E₂ es suficiente para disminuir el nivel de esta hormona (Burger L. et al, 2004).

En ratas Ovx, los AEs disminuyen la hormona luteinizante sérica (LH) con respecto a los controles. El orden de disminución de la LH es el siguiente: prolame > butolame > pentolame (Jaimez et al, 2000).

In vitro se evaluó la afinidad de los AEs por los receptores de estrógeno utilizando ensayos de unión a ER- α ; el orden de capacidad de unión al receptor de estrógeno es la siguiente: E₂> prolame > butolame > pentolame. (Jaimez et al, 2000).

Para evaluar la eficacia funcional de los AEs, se utilizaron células HeLa transfectadas con vectores de expresión para el receptor de estrógeno α (ER- α) y para el receptor de estrógeno β (ER- β) así como con elementos de respuesta a estrógenos (ERE) acoplados al gen de cloranfenicol acetiltransferasa (CAT). En este modelo se observó que los AEs tienen mayor afinidad y eficacia por el ER- α que por el ER- β en el siguiente orden: prolame>butolame>pentolame (Jaimez et al, 2000).

Sin embargo, el potencial estrogénico de los AEs no se ha evaluado en modelos de cáncer de mama y la determinación de estos efectos es fundamental para el desarrollo de estos compuestos en fases clínicas.

El ensayo de proliferación permite conocer el potencial estrogénico de compuestos en comparación con el E₂, el cual sirve de referencia ya que los efectos *in vivo* de esta hormona están bien documentados y se puede identificar el riesgo de compuestos estrogénicos (Vanparys et al. 2010). También, los compuestos que inducen o inhiben respuestas celulares del E₂ tienen valor potencial como candidatos para el desarrollo de fármacos que pueden ser utilizados para prevenir o controlar cáncer de mama que responde a estrógenos o para uso en la TRH.

1.5 TIPOS DE RECEPTORES DE ESTRÓGENOS.

Los receptores de estrógeno (ERs por sus siglas en inglés) más conocidos son los receptores citosólicos que participan en el mecanismo de acción clásico o genómico, induciendo la transcripción de genes blanco y cuyos efectos se observan en horas o días después de administrar E₂ (Marino et al, 2006).

Recientemente también se han documentado otros tipos de receptores de estrógeno en la membrana (metabotrópicos, GPR30 o mER) que inducen vías de señalización a través de segundos mensajeros y producen respuestas no genómicas que ocurren en segundos o minutos después de la administración de E₂ (Frick et al, 2011).

1.6 SUBTIPOS DE RECEPTORES DE ESTRÓGENO CITOSÓLICOS.

Estos receptores pertenecen a la superfamilia de receptores nucleares y son factores de transcripción inducibles por ligando que actúan sobre la regulación de genes específicos incrementando o inhibiendo su transcripción. Entre los genes más representativos regulados por E₂ en la línea celular MCF-7 están, *TFF1*, *IGFBP4*, *C3*, *ADORA1*, *GREB1* y *MYC* (Jagannathan et al, 2011).

Los dos subtipos de estos receptores son el ER- α y el ER- β que están codificados respectivamente por los genes *ESR1* y *ESR2* (Kumar et al, 2011). En la figura 2 se ilustra la homología estructural.

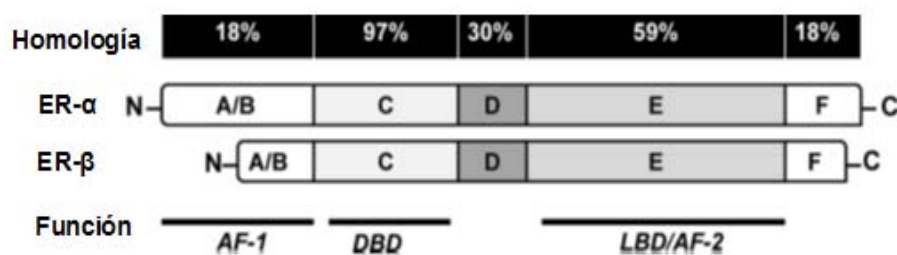


Figura 2. Diagrama esquemático de los dos subtipos de ERs humanos, ER α y ER β . Ambos receptores consisten de cinco dominios funcionales, que incluyen el dominio A/B en el extremo amino terminal, involucrado en las interacciones proteína-proteína, este dominio incluye a la función de activación transcripcional de genes blanco AF-1 y es independiente de ligando, el dominio C es el dominio de unión a DNA (DBD), el dominio D está involucrado en la localización nuclear del ER y los dominios E/F en el C-terminal contienen el dominio de unión a ligando (LBD) y la función de activación dependiente de ligando AF-2. Se indica el porcentaje de homología entre los dos receptores (Adaptado de Cui et al, 2013).

Ambos subtipos de receptores de estrógeno se expresan en los testículos, en las células de Leydig y espermatoцитos, sin embargo, en otros tejidos tienen una expresión diferencial.

El ER- α se expresa principalmente en el útero, próstata (estroma), mama (células lumbinales), ovario (células de la teca), hueso, epidídimo y varias regiones del cerebro, hígado y tejido adiposo blanco. El ER- β se expresa en la próstata (epitelio), colon, ovario (células de la granulosa), médula ósea, endotelio vascular, glándulas salivales y ciertas regiones del cerebro (Heldring et al, 2007).

Los ERs, además de tener la capacidad de reconocer a los estrógenos endógenos, también son blancos farmacológicos de diferentes sustancias exógenas que tienen actividad estrogénica. Por ejemplo, pesticidas, bisfenoles, sustancias naturales como fitoestrógenos y algunos fármacos como el 17 β -etinilestradiol que se usa como anticonceptivo (Diamanti-Kandarakis et al, 2009).

1.7 ISOFORMAS DE LOS RECEPTORES DE ESTRÓGENO CITOSÓLICOS

Existen distintas isoformas de receptores citosólicos que se originan del empalme alternativo de sus genes correspondientes. Para el subtipo α existe el receptor de longitud completa o integral que se denomina ER- α 66 así como las isoformas ER- α 36 (Wang et al, 2005) y ER- α 46 (Flouriot et al, 2000). Para el subtipo β hay 5 isoformas: ER- β 1- ER- β 5 (Moore et al, 1998).

A diferencia del receptor ER- α 66, la isoforma ER- α 46 es más pequeña porque carece del dominio A/B en el extremo amino terminal (Figtree et al, 2003). Esta isoforma de ER se ha identificado en osteoblastos humanos, células endoteliales vasculares (ECs) y en tejido de tumor mamario (Flouriot et al, 2000; Russell et al, 2000; Denger et al, 2001). La activación del ER- α 46 estimula a la sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS) que produce vasodilatación de células endoteliales humanas (Li et al, 2003).

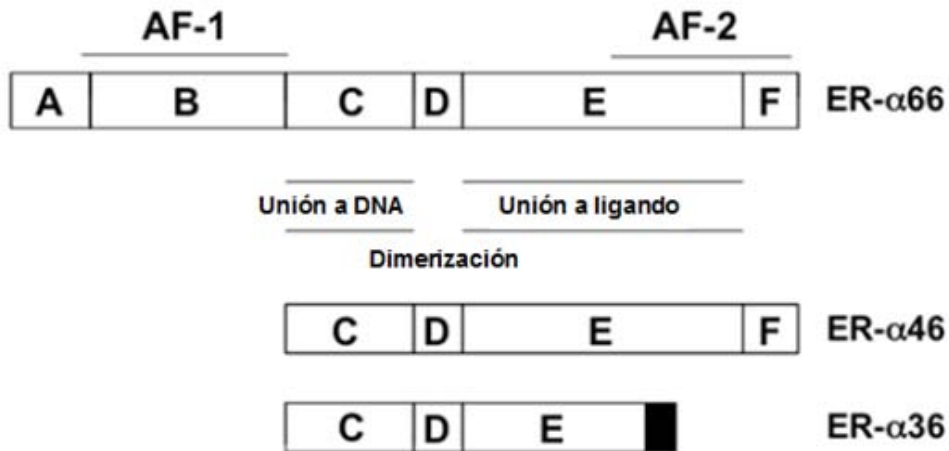


Figura 3. Estructura de dominios de las isoformas del ER- α en células de cáncer de mama MCF7. (Dominios (A-F) se muestran los dominios de la función de activación (AF-1 y AF-2). Se indica la función de cada dominio. La parte sombreada del ER- α 36 representa los últimos 27 aminoácidos de función desconocida (Adaptado de Zhiang et al, 2012).

La isoforma ER- α 36 (figura 3) a diferencia del ER- α 66, carece de los dominios de transactivación AF-1 y AF-2 y parte del dominio de unión ligando en el extremo C terminal y cuenta con una secuencia de 27 aminoácidos de función desconocida (Wang et al, 2005). Esta isoforma participa de manera importante en la proliferación de células de cáncer de mama activando la vía de las MAPK (Wang et al, 2006, Zhang et al, 2011). Aunque la isoforma ER- α 36 no es un receptor metabotrópico, varios autores la localizan en la membrana acoplada a una proteína G_q (ver figura 4). De acuerdo con esta propuesta, la interacción entre E_2 y ER- α 36 induce la síntesis de inositol trifosfato (IP_3) y diacilglicerol (DAG). El IP_3 promueve el flujo de calcio desde el retículo endoplasmático liso y el DAG ayuda a anclar a la proteína cinasa C (PKC) a la membrana celular, promoviendo la activación de PKC. Debido a que PKC activa a ERK1/2, estas cinasas rápidamente fosforilan a proteínas que promueven la proliferación (Chaudhri et al, 2012).

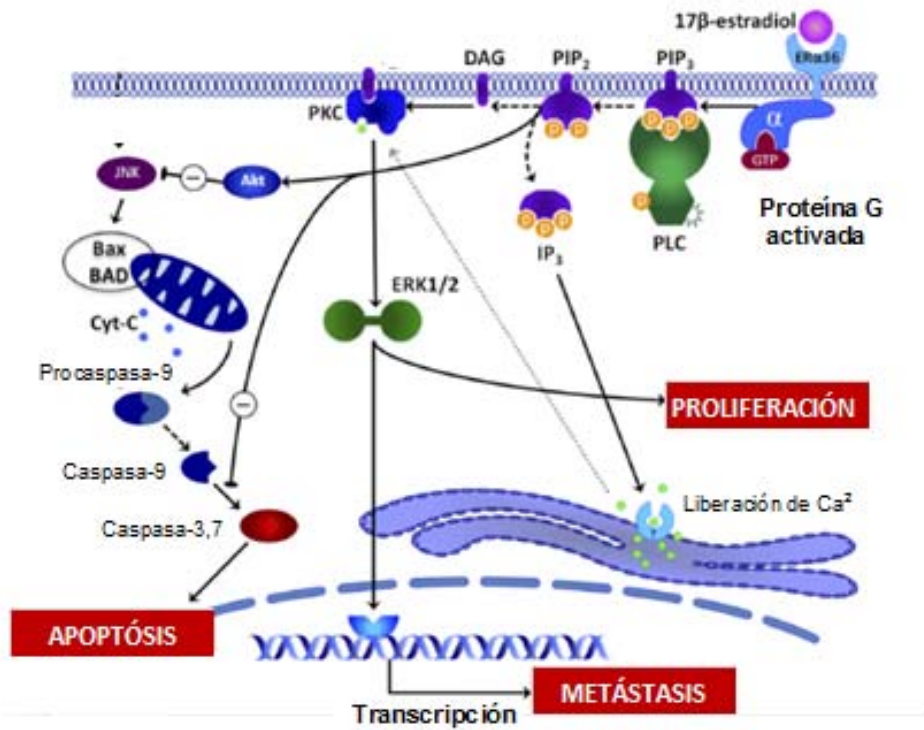


Figura 4. Modelo de rápida señalización iniciada en membrana por el E₂ a través del ER-α36. El E₂ interacciona con el ER-α36 en la membrana de la célula iniciando una cascada de señalización que conduce a la activación de cinasas reguladas por señal extracelular ERK1/2. La activación de ERK1/2 puede afectar a la proliferación celular, así como la fosforilación de factores de transcripción que pueden activar o reprimir la transcripción genética. La señalización de E₂ a través de isoformas de sus receptores anclados a membrana impide la apoptosis (Adaptado de Chaudhri, et al, 2012).

1.8 PARTICIPACIÓN DE LOS RECEPTORES DE ESTRÓGENO EN LA TRANSCRIPCIÓN (MODELO GENÓMICO).

En el mecanismo de acción genómico también conocido como canónico, el ER se encuentra en el citoplasma en estado monomérico (estado inactivo) formando un complejo con proteínas de choque térmico (Hsp90, Hsp70 y Hsp56). Cuando el E₂ se une al ER se producen cambios conformacionales en el receptor que provocan su disociación de las Hsps; entonces los ER se dimerizan y se translocan al núcleo. En el núcleo, estos dímeros se unen a secuencias específicas de DNA conocidas como elementos de respuesta a receptores de estrógenos (ERE) dentro de las regiones promotoras de genes blanco para regular

la transcripción genética y el RNA sintetizado será finalmente traducido a proteínas, las cuales producen cambios en la función celular (Ascenzi et al, 2006; Acconcia y Marino, 2011) figura 5 A.

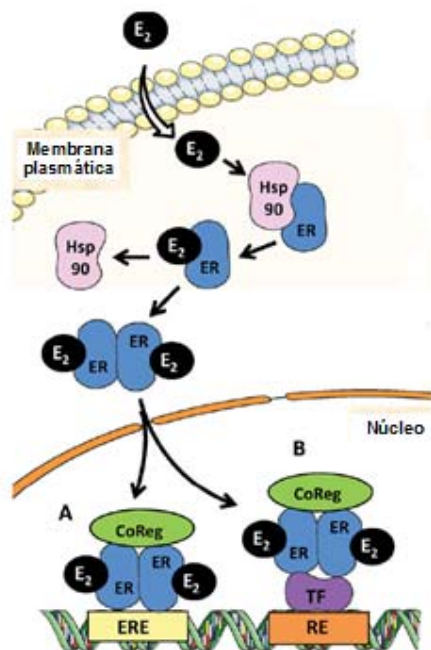


Figura 5. Vías canónicas de señalización del E₂ a través del ER. Vía A, es la vía genómica clásica directa; el ER unido al E₂ se dimeriza y después de un cambio de conformación, se dirige al núcleo, se une a ERE y recluta coreguladores (CoReg) que activarán la transcripción de genes blanco. Vía B, la vía genómica indirecta, involucra interacciones del ER con otros factores de transcripción (TF) como AP-1 y Sp1 (Adaptado de Le Romancer et al, 2011).

De manera dinámica y secuencial, los dímeros del ER reclutan varias proteínas co-regulatoras entre las que se incluyen coactivadores, co-represores, acetiltransferasas y desacetilasas de histonas, y factores generales transcripcionales (O' Malley y Kumar, 2009).

Los co-activadores (por ejemplo PRMT1 CBP/p300, SWI/SNF) interactúan con los ERs y facilitan su actividad transcripcional mediante la activación de remodelación

de la cromatina (Ascenzi et al, 2006). Por otro lado, los co-represores (por ejemplo, desacetilasas de histonas) evitan que los ERs induzcan la transcripción (Jepsen y Rosenfeld, 2002).

Además de la interacción directa con el DNA, los ERs se pueden unir indirectamente al DNA a través de interacciones proteína-proteína con otros factores de transcripción (figura 5 B). Por ejemplo, se une con la proteína activadora-1 (AP-1) que es un complejo compuesto por las proteínas c-JUN y c-FOS, que se unen al DNA regulando la transcripción de genes de forma independiente a los ERE. También el dímero del ER interacciona con la proteína de especificidad 1 (Sp1) (Heldring et al, 2007; Morissette et al, 2008; Acconcia y Marino, 2011).

La proteína LKB1 es una enzima serina-treonina que actúa como un co-activador en las células MCF-7. LKB1 se une al ER α en el núcleo de la célula, es reclutado en los promotores de genes blanco que responden a E₂ y favorece la transcripción (Nath-Sain S. et al, 2009).

El co-activador de receptor nuclear 1 (SRC-1) es una proteína con actividad histona acetiltransferasa intrínseca que le permite al ER- α comunicarse con la maquinaria general de transcripción, regula las modificaciones de la cromatina y finalmente regula la transcripción específica de genes, en las células MCF-7, casi todos los sitios de unión de SRC-1 se unen al ER- α y es dependiente de E₂ (Kininis et al, 2007).

1.9 RECEPTOR METABOTRÓPICO DE ESTRÓGENO O DE MEMBRANA (mER) Y SU PAPEL EN LA TRANSACTIVACIÓN.

Aunque la existencia de este receptor se había sugerido y demostrado desde hace varios años, solo hasta 2009 fue incluido dentro de la Guía de Receptores y Canales de la Unión Internacional de Farmacología (IUPHAR por sus siglas en inglés) (Alexander et al, 2009). Este receptor metabotrópico o de membrana (mER) también se ha denominado GPER y GPR30, tiene siete dominios transmembranales y está acoplado a proteínas G_s (figura 6). Participa en la señalización de eventos rápidos del E_2 (Alexander et al, 2011, Srivastava et al, 2013).

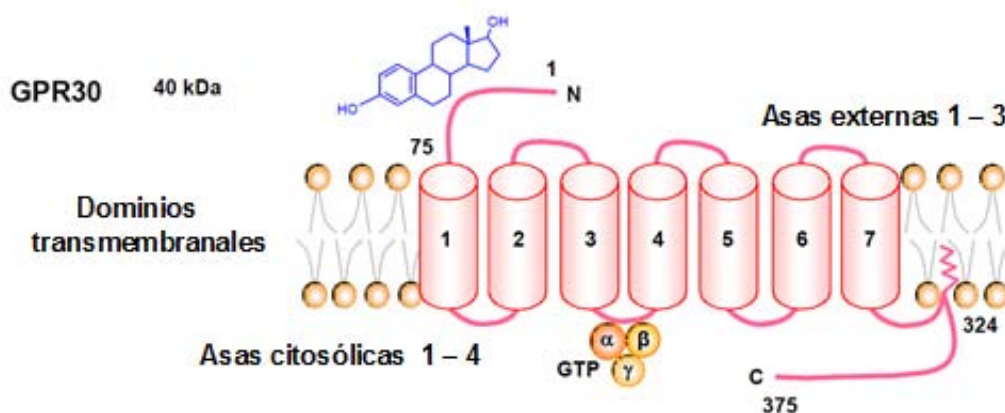


Figura 6. Estructura del receptor GPR30 acoplado a proteínas Gs con actividad estrogénica. GPR30 tiene un extremo N terminal extracelular, siete hélices α transmembranales, 3 asas de unión a ligando, 3 o 4 asas citosólicas que participan en la unión a proteínas G y un extremo C terminal unido a la membrana mediante adición de lípidos y que también participa en la unión a proteínas G (Adaptado de Khalil et al, 2013).

El GPR30 no está estructuralmente relacionado con el ER- α o ER- β pero une al E_2 con alta afinidad a concentraciones nanomolares (Prossnitz et al, 2008). Se expresa en el tejido óseo humano, en tejidos cardiovasculares (miocardio, endotelio vascular y células de músculo liso vascular), en túbulo renales, así como en células exocrinas del tracto gastrointestinal (Ford et al, 2011, Hofmeister

et al, 2012, Isensee et al, 2009). Es interesante que el antagonista para el ER- α como el ICI182,780 y antagonistas del ER- α y β como el Tamoxifeno, producen acciones agonistas en GPR30 (Meyer et al, 2010, Prossnitz et al, 2007). Otro agonista de GPR30 que se ha documentado es el G-1 (Bologa et al, 2006). También se han sintetizado antagonistas para este receptor como los compuestos G15, G36 (Dennis et al, 2011) y MIBE (Lappano et al, 2012).

El GPR30 se ha identificado en la membrana de células HEK293 epiteliales renales humanas (Filardo et al, 2007, Cheng et al, 2011), en algunas neuronas (Funakoshi et al, 2006) y en células MCF-7 de carcinoma humano mamario (Mo et al, 2013).

1.10 MECANISMOS DE SEÑALIZACIÓN ATRAVÉS DEL RECEPTOR DE ESTRÓGENO METABOTRÓPICO GPR30 Y SU PAPEL EN LA PROLIFERACIÓN.

Se ha demostrado que el E₂ estimula la proliferación de células MCF-7 a través de la activación de GPR30, permitiendo la transactivación del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) (Mo et al, 2013).

La transactivación del EGFR conduce a la activación de la vía ras-MAP-quinasa y transcripción de genes, lo que induce a la proliferación y la migración de células de cáncer (Filardo et al, 2000, Maggiolini et al, 2010). Sin embargo hay estudios que sugieren que GPR30 inhibe la proliferación de células de cáncer de mama con receptores de estrógeno positivo (ER⁺) (Ariazy et al, 2010, Li et al, 2010).

Entre las acciones rápidas que resultan de la activación de GPR30 y la transactivación del EGFR se encuentran la regulación positiva de genes que codifican para proteínas implicadas en la proliferación celular y la migración como el factor de crecimiento del tejido conjuntivo (CTGF), c-fos, Egr1 y la ciclina D1

(Pandey et al, 2009, Vivacqua et al, 2012, Albanito et al, 2007, Cui et al, 2011, Fu et al, 2004, Xiao et al, 2005).

1.11 SEÑALIZACIÓN MEDIANTE RECEPTORES CITOSÓLICOS CON RECEPTORES CON ACTIVIDAD TIROSINA CINASA.

Los receptores estrógeno están implicados en la inducción de vías de señalización no genómicas, también denominadas extra-nucleares, donde el receptor de membrana GPR30 y el ER- α anclado en la membrana plasmática o en sus proximidades, pueden interactuar con receptores tirosina cinasa (RTKs) y activar varias vías de señalización corriente abajo, entre las más importantes están la PI3K/AKT/mTOR y la Raf/ERK/MAPK (García R. et al, 2013).

1.11.1 Vía PI3K/AKT/mTOR

La vía de señalización de la fosfatidilinositol-3-cinasa (PI3K)/proteína cinasa B (AKT)/ blanco de rapamicina en mamíferos (mTOR) es un regulador clave de la proliferación celular y supervivencia (Manning B. et al, 2007).

La enzima PI3K es un heterodímero que consiste de dos subunidades, una catalítica (p110) y una reguladora [p85] (Graupera et al, 2008).

La enzima PI3K es activada en respuesta a la señalización tanto de los RTKs como de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs), y su activación es de mayor potencia con el receptor del factor de crecimiento semejante a insulina 1 [IGF-1R] (Adams JR et al, 2011).

Esta enzima PI3K fosforila al fosfatidilinositol 4, 5-bifosfato (PIP₂) para producir fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP₃), a su vez, PIP₃ recluta a AKT en la membrana plasmática, la cual es fosforilada y activada por la cinasa dependiente de fosfoinositol 1 (PDK1), la enzima AKT activa al blanco de rapamicina de mamífero (mTOR), esta cascada de eventos es crítica para la progresión del ciclo celular (Gewinner C. et al, 2009).

La vía señalización PI3K/AKT/mTOR induce la actividad transcripcional del ER- α independiente de E₂, por lo tanto, promueve la proliferación celular en ausencia de E₂ (Geisler J. et al, 2008).

El ER- α promueve la transcripción de varios genes que codifican efectores corriente arriba de la vía PI3K/AKT/mTOR, incluyendo, RTKs y sus ligandos así como proteínas adaptadoras (Miller T. et al, 2011).

1.11.2 Vía Raf/MEK/ERK

La vía Raf/MEK/ERK, también es conocida como vía de la proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK), en forma similar a la vía PI3K, transmite señales desde los RTKs y GPCRs de la membrana plasmática hacia factores de transcripción (Henson S. et al, 2006).

Se conocen tres vías MAPK pero la más relevante en cáncer de mama es en la que participan las enzimas MEK1/2 y ERK1/2. El módulo de las tres cinasas (Raf/MEK/ERK) es importante para el desarrollo fisiológico normal y también para la carcinogénesis (Poulikakos P. et al, 2011).

1.11.3 Vías de señalización por receptores del factor de crecimiento epidérmico.

El receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, ERBB) pertenece a la superfamilia de receptores localizados en la membrana plasmática que presentan actividad tirosina cinasa intrínseca y tiene un papel crucial en la proliferación y supervivencia de las células de cáncer de mama. (Normanno N. et al, 2006)

La familia del EGFR está representada por cuatro miembros: EGFR (HER1 o ERBB1), HER2 (ERBB2), HER3 (ERBB3) y el HER4 (ERBB4). Cuando los ligandos se unen al dominio extracelular de EGFR, HER3 y HER4, se induce la formación de homo y heterodímeros, Aunque HER2 no tiene ligando conocido, tiene una conformación que favorece su dimerización con HER1 (Citri et al, 2006).

En la activación por ligandos de los receptores HER2 y EGFR, se induce su transfosforilación y se activan las vías intracelulares corriente abajo, entre las más caracterizadas están la Raf/ERK/MAPK y la PI3K /AKT/mTOR que median la proliferación y supervivencia en células de cáncer de mama [Figura 7] (Yarden Y.; Pines G., 2012).

En células MCF-7, las vías de señalización MAPK y PI3K/AKT procedentes de EGFRs activados por ligando, como HER2, pueden fosforilar al ER- α y activarlo de manera independiente de ligando. Estas mismas cinasas también pueden fosforilar y activar a coactivadores del ER- α , como a SRC-3 (también conocido como AIB1 (amplificados en cáncer de mama)). Esto resulta en la activación de la actividad transcripcional alternativa del ER- α que depende principalmente de sitios de AP-1 en el DNA (Wang Y. et al, 2008).

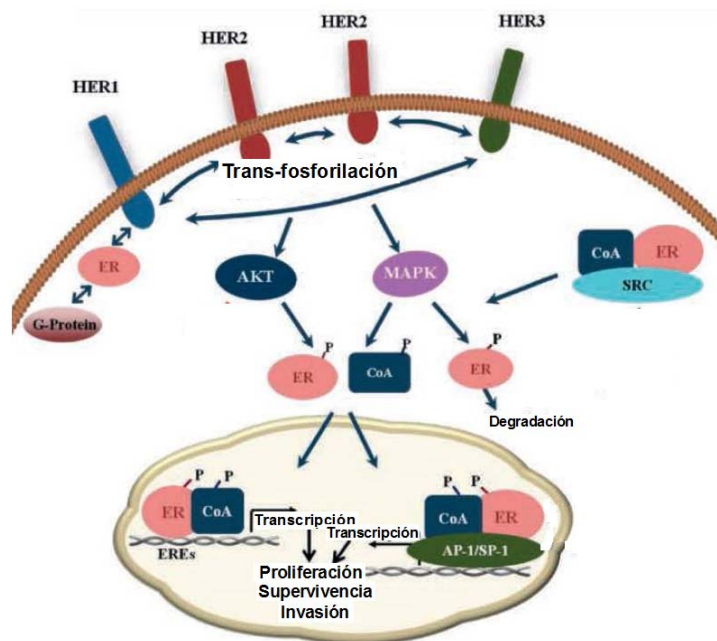


Figura 7. Interacción entre las vías de señalización del ER- α y HER. En presencia de la señalización de receptores del factor de crecimiento, las cinasas activadas corriente abajo (AKT y MAPK) estas fosforilan al ER- α y a sus coactivadores potenciando y modulando la actividad transcripcional del ER- α . Además, la actividad de los ER anclados o cerca de la membrana plasmática se incrementa para llevar a una mayor actividad de la vía HER por interacción directa o indirecta con los receptores HER y proteínas G. (Adaptado de Gaben A. et al, 2012).

La señalización del E₂ independiente de ligando también puede aumentar la expresión de factores de crecimiento como la del factor de crecimiento semejante

a insulina 1 (IGF1) lo cual, refuerza la respuesta proliferativa en las células de cáncer de mama (Giuliano M. et al, 2013).

1.11.4 Vías de señalización por receptores del factor de crecimiento semejante a insulina (IGF-1R).

La unión del factor de crecimiento semejante a insulina 1 y 2 (IGF-1 y IGF-II respectivamente) activan vías de señalización intracelulares que regulan la proliferación y la supervivencia (Figura 8). El receptor IGF-1R es un receptor transmembranal con actividad tirosina cinasa que funciona como homo o heterodímero con el receptor de insulina I. Cuando el IGF1 se une al IGF-1R se inducen dos diferentes vías de señalización, la vía Shc/Ras/Raf/MAPK y la vía PI3K/AKT/mTOR, llevando a una proliferación acelerada (Manning B. et al. 2007).

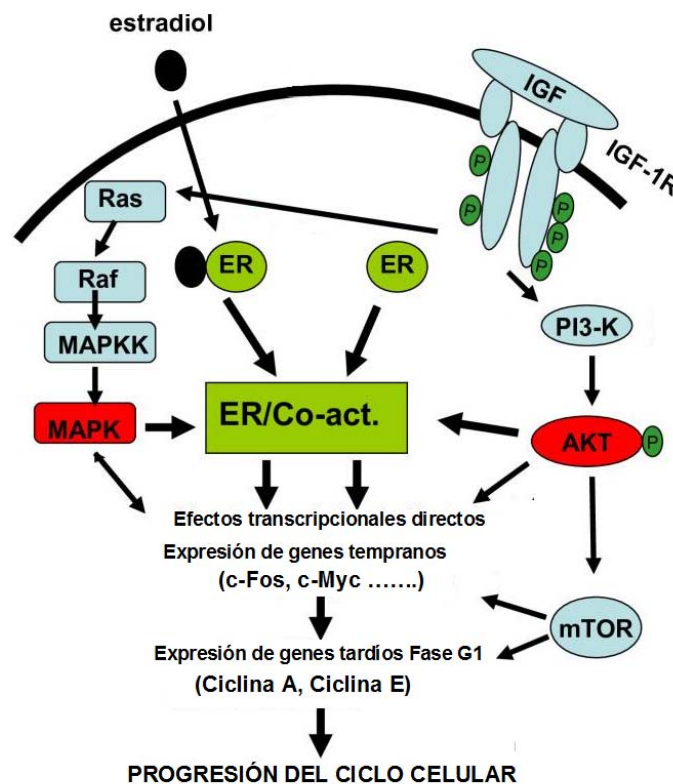


Figura 8. Interdependencia entre las vías de señalización del receptor semejante a insulina 1 (IGF-1R) y la del el receptor del estrógeno (ER-α). La unión de ligando al IGF1R activa las vías de señalización PI3K/AKT y la MAPK (Adaptado de Gaben A. et al, 2012).

La unión del ligando al IGF-1R activa las vías de señalización PI3K/AKT y la MAPK. En forma semejante a lo que sucede con las vías de señalización de receptores del factor de crecimiento epidérmico, a través de las vías PI3K/AKT Y MAPK se fosforila al ER- α o a sus coactivadores para modular la actividad transcripcional del ER- α independiente y dependiente de ligando. A su vez, el ER- α transcribe genes que codifican los componentes de las vías de señalización del IGF-1R, completando así el ciclo de señalización del IGF-1R al ER- α y hacia el IGF-1R (Gaben A. et al, 2012).

2. JUSTIFICACION

En las células de tumores mamarios existen alteraciones en múltiples vías de señalización que originan la desregulación de la proliferación y disminuyen la apoptosis. Los estrógenos tienen importantes efectos estimuladores sobre la proliferación, por lo que el uso de estos compuestos en poblaciones de mujeres con riesgo de tumores malignos limita su uso. Por lo que es importante desarrollar agentes terapéuticos más seguros para la terapia de remplazo hormonal (TRH).

Por sus efectos anticoagulantes, los 17 β -aminoestrógenos son fármacos prometedores para su inclusión en la TRH y sin posibles riesgos de producir efectos trombóticos. Sin embargo, no se han documentado aún sus efectos en líneas de tumores malignos que respondan a estrógenos.

Por lo anterior, es necesario evaluar las propiedades estrogénicas de los 17 β -aminoestrógenos en la proliferación de células MCF-7, para seleccionar aquel que sea más seguro y con mejor potencial terapéutico.

2.1 HIPÓTESIS

Si el E₂ produce efectos bifásicos en la proliferación de las células MCF-7 de carcinoma mamario humano, entonces los aminoestrógenos presentarán efectos similares, incrementarán la fase S del ciclo celular e inducirán la expresión del gen *CCND1* con menor magnitud que el E₂.

2.2 OBJETIVOS

2.2.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar los parámetros farmacodinámicos de los aminoestrógenos prolame, butolame y pentolame en la proliferación de células MCF-7 de carcinoma mamario humano.

2.2.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Comparar la actividad farmacológica de E₂ y de los AEs prolame, butolame y pentolame sobre la proliferación de las células MCF-7 a través de ensayos *in vitro* en el modelo MTT.
2. Obtener los parámetros farmacológicos de concentración efectiva 50 (CE₅₀), concentración inhibitoria 50 (CI₅₀), eficacia proliferativa relativa (RPE) y potencia proliferativa relativa (PPR) de prolame, butolame y pentolame en un sistema *in vitro* en condiciones estrogénicas y no estrogénicas.
3. Evaluar el efecto de prolame, butolame y pentolame sobre la distribución del ciclo celular por medio de citometría de flujo.
4. Evaluar el efecto de prolame, butolame y pentolame sobre la expresión de ciclina D1 por PCR en tiempo real.
5. Determinar el potencial estrogénico de los tres AEs en la proliferación de células MCF-7 y proponer el más adecuado para estudios preclínicos posteriores.

3. METODOLOGÍA

3.1 REACTIVOS

Los reactivos utilizados en este estudio son: 17 β -estradiol (E₂; 1,3,5(10)-estratrien-3,17 β -diol) el cual se obtuvo comercialmente de Sigma Chemical (St. Louis, MO). Prolame (17 β -(3-hydroxy-1-propylamino)-1,3,5(10)-estratrien-3-ol), butolame 17 β -(4-hydroxy-1-butylamino)-1,3,5(10)-estratrien-3-ol) y pentolame (17 β -(5-hydroxy-1-pentylamino)-1,3,5(10)-estratrien-3-ol) que fueron sintetizados por métodos previamente reportados (Lemini et al, 1993, Fernández et al, 1983)

Para los ensayos se usaron placas de 96 pozos (Falcon), medio Eagle modificado de Dulbecco (Sigma), suero fetal bovino (SFB) de Gibco, aminoácidos no esenciales (Gibco), piruvato de sodio, (Gibco), solución de penicilina/estreptomicina (Gibco), ICI 182,780 (Sigma), Azul de Trypan (Sigma), Ioduro de Propidio (PI) (Sigma), RNAsa A (Sigma) y Tripsina (Gibco).

Finalmente, se prepararon soluciones en etanol (stocks) a la concentración de 0.1 M de E₂, prolame, butolame y pentolame, a partir de las cuales se realizaron diluciones con medio de cultivo para alcanzar las siguientes concentraciones: 10⁻¹⁵, 10⁻¹⁴, 10⁻¹³, 10⁻¹², 10⁻¹¹, 10⁻¹⁰, 10⁻⁹, 10⁻⁸, 10⁻⁷ y 10⁻⁶ M. La mayor concentración de solvente (etanol) en el medio de cultivo fue de 0.01% (v/v).

3.2 TRATAMIENTO DEL SUERO FETAL BOVINO CON CARBÓN-DEXTRÁN PARA ELIMINAR HORMONAS ESTEROIDES (Stanley et al, 1997).

El suero fetal bovino (SFB) fue enfriado en hielo y se agitó durante 30 minutos a 0°C. Se preparó una suspensión acuosa de carbón (Norit A lavado en ácido) al 10% p/v y Dextrán T-70 al 0.05% p/v. Por cada 100 ml de SFB se le adicionaron 5 ml de la suspensión acuosa carbón-dextrán, se ajustó el pH a 4.2 con HCL 4 N y se agitó durante 24 h a 4° C. Posteriormente, la mezcla se centrifugó a 3400 rpm a 4° C por 30 minutos. El sobrenadante se ajustó a pH 7.2 con NaOH 4 N. Se filtró a través de una membrana de 0.45 μ m estéril hasta que perdió el color negro.

Después se filtró con membrana de 0.22 μm estéril y se congeló a -20°C hasta su uso. El suero fetal bovino que resulta de este tratamiento se le denominó SFB C/D.

3.3 TIPOS DE MEDIO Y CONDICIONES DE CULTIVO

Medio de cultivo para condiciones estrogénicas: Medio Dulbecco Modificado de Eagle (DMEM) con rojo fenol, alto en glucosa, suplementado con 10% (V/V) de SFB con complemento inactivado por calor, 1% (v/v) amino ácidos no esenciales, 1% (v/v) piruvato de sodio y 1% (v/v) de solución de penicilina/estreptomicina 10 mg/L.

Medio de cultivo para condiciones no estrogénicas: DMEM sin rojo fenol, alto en glucosa, suplementado con 10% (v/v) de suero fetal bobino tratado con carbón-dextrán (SFB C/D) con complemento inactivado por calor, 1% (v/v) amino ácidos no esenciales, 1% (v/v) piruvato de sodio y 1% (v/v) de solución de penicilina/estreptomicina 10 mg/L.

Medio de arresto: Medio DMEM sin rojo fenol suplementado con 0.5% de SFB C/D y 10 nM de ICI 182,780 el cual es un antagonista de los ERs α y β y se utiliza para inducir arresto en fase G1 del ciclo celular.

3.4 LÍNEA CELULAR

La línea celular de adenocarcinoma mamario humano MCF-7 fue obtenida de American Type Culture Collection (ATTC Number HTB-22).

Las células fueron cultivadas en botellas de 50 cm^2 de área de cultivo (Nunc), a 37°C , en atmosfera humidificada y con inyección de CO_2 al 5% (máximo de 15 pases). Rutinariamente las células fueron crecidas en medio estrogénico y posteriormente incubadas con el medio de cultivo correspondiente para cada tipo de ensayo. Para los ensayos de citometría de flujo y de PCR en tiempo real, las

células fueron sincronizadas en medio de arresto por 12 horas y lavadas para después ser incubadas en medio no estrogénico.

Las células fueron desprendidas de la caja por tripzinización (solución de tripsina-EDTA al 0,25% a 37°C), durante 10 minutos, posteriormente fueron centrifugadas para obtención del botón celular. Las células fueron resuspendidas en un volumen conocido de medio y su viabilidad fue estimada por el método de exclusión de azul tripán en cámara de Neubauer. La viabilidad de las células que se utilizaron en los ensayos siempre fue mayor al 90 %.

3.5 ENSAYO DE REDUCCIÓN DE MTT (BROMURO DE 3-(4,5-DIMETILTIAZOL-2-IL)-2,5-DIFENIL TETRAZOLIO) PARA EVALUAR LA PROLIFERACIÓN CELULAR DE LAS CÉLULAS MCF-7

Este ensayo se basa en la capacidad de las deshidrogenasas mitocondriales de células vivas de reducir la sal de MTT que es hidrosoluble y de color amarillo, a formazán de MTT (1-(4,5-dimetiltiazol-2-il) 3-3,5-difenilformazan), la cual es insoluble en agua y de color púrpura. La absorbancia del formazán de MTT es proporcional al número de células vivas.

Después del periodo de exposición a los fármacos, las células se incubaron con MTT (0.05%) por dos horas a 37°C; al finalizar este periodo, el sobrenadante fue retirado. Los cristales de formazán fueron disueltos en dimetil sulfóxido (DMSO) y su absorbancia fue leída en un lector de microplacas Biotek EL311 a una longitud de onda de 570 nm.

Las células MCF-7 fueron sembradas en placas de 96 pozos a una densidad de 2500 células por pozo en 200 μ l, se incubaron a 37° C y 5% CO₂ por 12 horas para su adhesión. Fueron expuestas al E₂ o AEs durante 6 días. Cada concentración se evaluó por octuplicado (n=8); las células control sólo recibieron medio con 0.01 % (v/v) de etanol. Cada experimento fue realizado al menos tres veces. En condiciones estrogénicas se utilizaron las concentraciones de E₂ y AEs de 10⁻¹² a 10⁻⁶ M y para condiciones no estrogénicas se utilizaron las

concentraciones E₂ de 10⁻¹⁵ a 10⁻⁷ M y para los AEs, las concentraciones utilizadas fueron de 10⁻¹³ a 10⁻⁶ M.

3.6 ESTIMACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN DE LAS CÉLULAS MCF-7

Al final de 6 días de exposición a los fármacos, se estimó el porcentaje del efecto proliferativo (%EP) de las células tratadas con respecto a las células control de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\%EP = ([T/C] - 1) \times 100$$

Donde EP= Efecto proliferativo; T= células tratadas, C= células control.

Los valores de T y C son las lecturas promedio de absorbancia a la longitud de onda de 570 nm obtenidos por medio del ensayo de MTT.

3.7 ESTIMACIÓN DE LA EFICACIA PROLIFERATIVA RELATIVA (EPR) Y POTENCIA PROLIFERATIVA RELATIVA (PPR) DE LOS AMINOESTRÓGENOS EN RELACIÓN AL ESTRADIOL.

La Eficacia Proliferativa Relativa (EPR) expresa el efecto proliferativo máximo de cada compuesto con respecto al estradiol y se calcula con la fórmula:

$$\% EPR = EP_{\text{máxAEs}} / EP_{\text{máxE}_2} \times 100$$

% EPR indica si el aminoestrógeno induce una respuesta proliferativa cuantitativamente similar a la obtenida con E₂, esto es, un agonista total o una respuesta proliferativa menor a la obtenida con E₂, es decir, un agonista parcial. (Soto et. al. 1995).

El término de potencia se refiere a la concentración que se requiere para alcanzar el 50 % de la proliferación. La Potencia Proliferativa Relativa (%PPR) expresa la magnitud de la potencia de cada compuesto en relación al E₂. Una PPR de 100

indica que la potencia proliferativa del aminoestrógeno es equivalente a la del E₂. La PPR se calcula con la siguiente fórmula:

$$\%PPR = EC50_{E_2} / EC50_{AEs} \times 100$$

A diferencia de Soto et al. 1995, para calcular PPR, en este estudio se utilizó la Concentración Efectiva 50 (CE50) en lugar de la concentración Efectiva Máxima.

3.8 EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LOS COMPUESTOS EN EL CICLO CELULAR DE CÉLULAS MCF-7 POR CITOMETRÍA DE FLUJO.

La citometría de flujo es una técnica que permite cuantificar el número de células en cada una de las fases del ciclo celular de acuerdo a su contenido de DNA, el cual se evalúa a través de la señal emitida por su unión al yoduro de propidio.

Las células MCF-7 (1×10^6) fueron incubadas en cajas Petri de 100 mm de diámetro en medio no estrogénico suplementado con 10 % SFB C/D para su adhesión a la superficie durante 24 h y después fueron lavadas con PBS. Para su sincronización, las células fueron incubadas en medio de arresto por 12 horas. Al término de este tiempo, las células fueron nuevamente lavadas e incubadas en medio no estrogénico y expuestas a su respectivo tratamiento con E₂ o aminoestrógenos a la concentración 10^{-10} M por un periodo de 24 h o 48 horas.

Después del tratamiento con E₂ o AEs, las células fueron cosechadas, lavadas con PBS frío y, resuspendidas en 1 ml de PBS. Para su fijación, se agregó etanol absoluto frío por goteo hasta alcanzar una concentración final de etanol al 70 %, fueron agitadas suavemente con el vortex y se incubaron por 12 horas a 4°C.

Después de la fijación las células fueron lavadas dos veces con PBS y el botón celular fue resuspendido en 1 ml de solución de Tinción (RNAsa A 0.5 mg/ml, yoduro de propidio 10 µg/ml y buffer de citrato de sodio 1.1%) e incubado a 37° C en oscuridad durante 1 hora. Las células (10^4) fueron adquiridas a alta velocidad

(100 eventos por segundo) en el citómetro Becton Dickinson FACScan y se leyó a 488 nm utilizando el programa Cellquest versión 3.3. Los histogramas de DNA se analizaron con el programa Tree Star Inc Flowjo (Versión 8.7).

3.9 EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE CICLINA D1 POR MEDIO DE PCR EN TIEMPO REAL EN CÉLULAS MCF-7

Las células fueron tratadas de la misma manera que se indicó previamente. La expresión de gen *CCND1* se evaluó a las 6 horas de exposición con base a la cinética que se realizó previamente (ver inciso 3.7, figura 18). Después del tratamiento las células fueron lavadas dos veces con PBS frío y se procedió a la extracción de RNA. Se agregó 1 mL de Trizol® a la caja Petri y la superficie fue raspada con un gendarme, el sobrenadante se pasó a un tubo tipo eppendorf de 1.5 ml y se agregaron 200 µL de mezcla cloroformo:alcohol isoamílico. Se centrifugó por 15 minutos, a 4°C a 12,000 rpm. La fase acuosa fue recuperada y se le agregaron 500 µL de isopropanol, se dejó incubando a -20 °C toda la noche, posteriormente se centrifugó por media hora a 12 000 rpm a 4 °C. Se eliminó el sobrenadante y el botón fue lavado dos veces con etanol al 75% y se dejó secar el exceso de etanol. El RNA obtenido fue resuspendido en 50 µL de agua estéril con 0.01 % de dietil pirocarbonato (DEPC) y se le adicionaron 2 µl de inhibidor de RNAsas. Para determinar la pureza del RNA se realizaron diluciones de las muestras (5 µL RNA y 60 µL de agua DEPC), se midió la absorbancia a 260 y 280 nm en el espectrofotómetro y se calculó el cociente entre las longitudes de onda. Para los ensayos sólo se emplearon las muestras biológicas que tuvieron un cociente entre 1.6 y 3.0. Para comprobar la integridad del RNA, se corrieron muestras de los mismos en geles de agarosa al 1 % utilizando una cámara Bio-Rad Mini-Sub® Cell GT a 100 mV.

Para llevar a cabo la evaluación de la expresión del gen *CCND1* que codifica para la ciclina D1 en células MCF-7 se utilizó la técnica de PCR en tiempo real. Se usó el kit de un solo paso para sintetizar cDNA y amplificar las copias del transcrito (SuperScript® III Platinum® SYBR® Green One-Step QRT-PCR).

Las secuencias de los iniciadores (primers) que se emplearon aparecen en la Tabla I.

Tabla I. Secuencia de iniciadores para la amplificación de los genes *CCND1* y *GAPDH*.

GEN	Iniciador sentido	Iniciador anti-sentido
Ciclina D1 de <i>Homo sapiens</i> (<i>CCND1</i>)	GACCTTCGTTGCCCTCTGT	GCGGTAGTAGGACAGGAAGTT
<i>GAPDH</i> de <i>Homo sapiens</i>	AGCCACATCGCTCAGACAC	GCCCAATACGACCAAT

Para cada tubo capilar de reacción, se utilizó un volumen total de 10 µL de una mezcla con los componentes que se describen en la Tabla II.

El control de amplificación contiene todos los reactivos necesarios para la reacción de amplificación excepto RNA. Todos los componentes se mezclaron y se depositaron con micropipeta en la parte inferior del capilar de reacción.

Tabla II. Componentes de la mezcla de reacción para PCR en tiempo real.

Componente	Volumen
SuperScript® III RT/ Platinum® <i>Taq</i> Mix	0.2 µl
2X SYBR® Green Reaction Mix	5 µl
Iniciador sentido (10 µM)	0.2 µl
Iniciador anti-sentido (10 µM)	0.2 µl
RNA total (0.5 µg)	x µl
Agua DPEC	c.b.p. 10 µl

Posteriormente se colocaron en un termociclador Corbett con las siguientes condiciones de corrida: 50°C/3 min (síntesis de cDNA), 95 °C por 5 min (desnaturalización) y cuarenta ciclos de 95°C/15 s (desnaturalización) y 60°C/30 s (elongación). Los resultados fueron analizados utilizando el programa Rotor-Gene 6000 Software 1.7.

3.10 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se analizó la significancia estadística entre los grupos empleando un análisis unidireccional de la varianza (ANOVA). La significación de las diferencias entre los datos de proliferación de células control y las células tratadas se evaluó por el método de Dunn o de Dunnett, según fuera necesario (Zar, 1984). El análisis se realizó utilizando el programa Sigma Stat 3.1, Copyright 2001. Jandel Corporation. Los resultados se expresaron en promedio \pm error estándar (EE). Valores de $P < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos. Los datos de todos los casos son representativos de al menos tres experimentos independientes. Los valores de concentración efectiva 50 (CE_{50}) y de concentración inhibitoria 50 (CI_{50}) se calcularon a partir de las correspondientes curvas concentración-respuesta.

4. RESULTADOS

4.1 CURVAS CONCENTRACIÓN-RESPUESTA DE ESTRADIOL Y AMINOESTRÓGENOS.

Después de 6 días de exposición a los fármacos (E_2 , prolame, butolame y pentolame), se estimó el porcentaje del efecto proliferativo (%EP) de las células tratadas con respecto a las células control como se describe en el inciso 2.6. Para cada compuesto, a partir de su respectiva curva concentración-respuesta se determinó la concentración mínima a la que se observa la respuesta máxima (Concentración^a) que fue de 10^{-10} M, con excepción del E_2 en condiciones no estrogénicas, tuvo un valor fue de 10^{-11} M.

La CE_{50} de E_2 (CE_{50E2}) y de los 17β -aminoestrógenos (CE_{50AE}) se calculó utilizando las curvas concentración-respuesta con el programa Sigma-Plot (ver figura 9). Las concentraciones inhibitorias CI_{50} de cada compuesto fueron obtenidas de las gráficas en fase inhibitoria (ver figura 10).

4.2 CONDICIONES ESTROGÉNICAS

En condiciones estrogénicas tanto el E_2 como los AEs tuvieron una respuesta proliferativa bifásica (Figura 9).

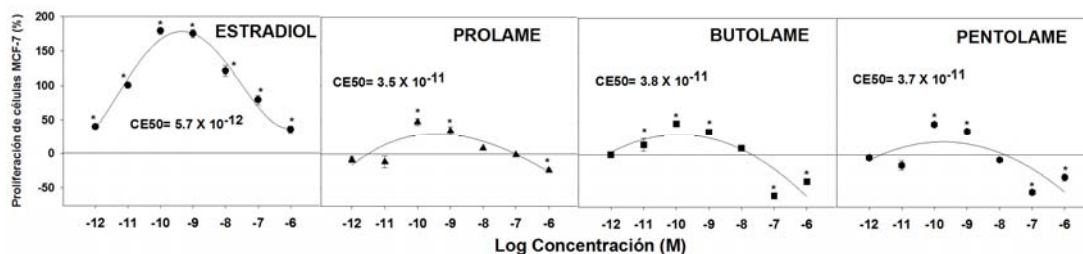


Figura 9. Respuesta bifásica observada en las curvas concentración respuesta del E_2 y AEs bajo condiciones estrogénicas (medio DMEM con rojo fenol y suplementado con 10% SFB) a los 6 días de exposición. Los porcentajes de proliferación representan el valor promedio \pm EE de al menos tres experimentos independientes ($n=3$), * $P < 0.05$.

A bajas concentraciones (10^{-12} M a 10^{-10} M) hubo un aumento de la proliferación que alcanzó un máximo a la concentración de 10^{-10} M.

En los intervalos de concentración en donde aumentó la proliferación (10^{-12} M a 10^{-10} M), el E₂ tuvo un valor de efecto proliferativo máximo (%EPmáx) de 179% con respecto al control y una CE₅₀ de 5.7×10^{-12} M. Por su parte, los aminoestrógenos tuvieron %EPmáx entre 46 y 48% (ver tabla III). Los valores de CE₅₀ de los AEs fueron de mayor magnitud con respecto al E₂, pero similares entre sí (de 3.5 a 3.8×10^{-11} M). Al calcular la magnitud del efecto relativo de los aminoestrógenos con respecto al E₂, tampoco se observaron diferencias significativas entre los porcentajes de eficacia proliferativa relativa (% EPR) y el porcentaje de la potencia proliferativa relativa (% PPR) de los AEs.

Tabla III. Parámetros farmacodinámicos del efecto de los aminoestrógenos sobre la proliferación de células MCF-7 medidas en condiciones estrogénicas.

Compuesto	Concentración ^a	%EPmáx	CE ₅₀	EPR %	PPR %
Estradiol	10^{-10}	179	5.7×10^{-12}	100	100
Prolame	10^{-10}	48	3.5×10^{-11}	27	17
Butolame	10^{-10}	47	3.8×10^{-11}	26	15
Pentolame	10^{-10}	46	3.7×10^{-11}	26	16

Porcentaje de Efecto Proliferativo Máximo (%EPmáx), Concentración mínima a la cual se alcanza la respuesta máxima (Concentración^a), Concentración Efectiva 50 (CE₅₀), Eficacia proliferativa relativa (%EPR) y Potencia proliferativa relativa (% PPR).

En contraste, a concentraciones mayores (10^{-9} M a 10^{-6} M), todos los compuestos indujeron disminución de la proliferación con respecto a la respuesta máxima. En el caso del E₂, la disminución nunca llegó a ser menor que la proliferación de las células control; por el contrario los tres AEs inhibieron significativamente la proliferación por debajo de los valores de las células control (ver figura 10). El prolame fue el compuesto que inhibió en menor magnitud la proliferación ($IC_{50} = 2.8 \times 10^{-8}$). El efecto inhibitorio de butolame y pentolame fue similar para ambos compuestos (3.2×10^{-8} y 3.4×10^{-8} M respectivamente) pero de mayor magnitud que el prolame.

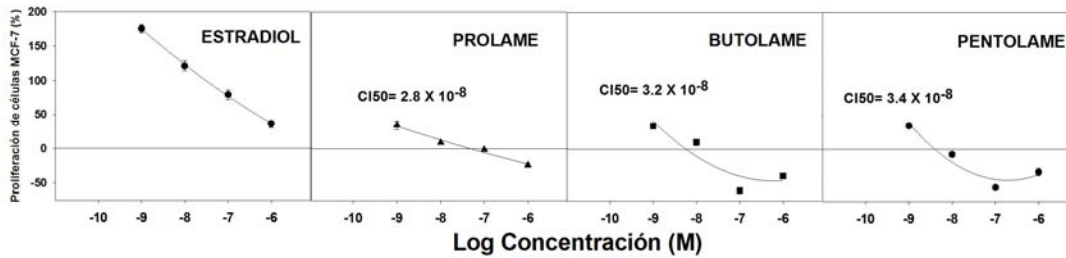


Figura 10. Fase inhibitoria en condiciones estrogénicas de E₂ y AEs. Los porcentajes de proliferación para cada punto representan el valor promedio de tres experimentos independientes (\pm EE), *P < 0.05.

Paradójicamente, butolame y pentolame presentan una mayor inhibición, a la concentración 10^{-7} M (59 y 55 % que a la concentración de 10^{-6} M (39 y 33 % respectivamente). Esta aparente discrepancia podría ser el resultado de interacciones entre componentes del medio y los compuestos, como se indica más adelante (inciso 4.4).

4.3 CONDICIONES NO ESTROGÉNICAS.

En condiciones no estrogénicas el E₂ y los AEs tuvieron una respuesta proliferativa bifásica similar a la que se observó en condiciones estrogénicas, pero de diferente magnitud (figura 11).

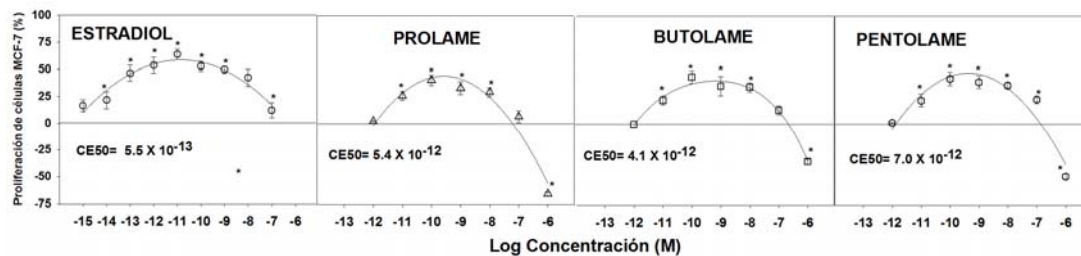


Figura 11. Curvas concentración-respuesta del E₂ y AEs en condiciones no estrogénicas. Los porcentajes de proliferación para cada punto representan el valor promedio de al menos tres experimentos independientes (\pm EE).

El E₂ aumentó la respuesta proliferativa entre las concentraciones 10^{-15} M y 10^{-11} M, teniendo un porcentaje de proliferación máxima (%EPmáx) de 64 % y una CE₅₀ de 5.5×10^{-13} M (ver figura 11). En el caso de los aminoestrógenos, el butolame fue el compuesto más eficaz con un valor de EPR de 69%; sin embargo

no se observaron diferencias entre los EPR de prolame y pentolame (64% y 65% respectivamente). En cuanto a potencia, el butolame fue el más potente con una PPR de 13%, seguido por prolame (10%) y por el pentolame (8%).

Aunque los valores de %EPmáx, %EPR y %PPR fueron similares para los tres aminoestrógenos y no hubo diferencias estadísticamente significativas, butolame fue el que presentó los valores más altos.

Tabla IV. Parámetros farmacodinámicos del efecto de E₂ y los AEs sobre la proliferación de células MCF-7 medidas estimadas en condiciones no estrogénicas.

Compuesto	Concentración ^a	%EPmáx	CE ₅₀	% EPR	% PPR
Estradiol	10 ⁻¹¹	64	5.5x10 ⁻¹³	100	100
Prolame	10 ⁻¹⁰	41	5.4x10 ⁻¹²	64	10
Butolame	10 ⁻¹⁰	44	4.1x10 ⁻¹²	69	13
Pentolame	10 ⁻¹⁰	42	7.0x10 ⁻¹²	65	8

Porcentaje de Efecto Proliferativo Máximo (%EPmáx), ^aConcentración mínima a la cual se alcanza la respuesta máxima (Concentración), Concentración Efectiva 50 (CE₅₀), Eficacia proliferativa relativa (%EPR) y Potencia proliferativa relativa (% PPR).

A concentraciones mayores (10⁻¹⁰ M a 10⁻⁷ M), la respuesta proliferativa del E₂ disminuyó pero no hubo una respuesta inhibitoria por debajo del control, por lo que no se estimó la CI₅₀ (figura 12). En el caso de los AEs solo se observaron efectos inhibitorios a la concentración de 10⁻⁶, siendo el butolame el que produjo la mayor inhibición (CI₅₀ = 9.8 x10⁻⁸ M), seguido del prolame (CI₅₀ = 4.3 x10⁻⁸ M) y finalmente el pentolame (CI₅₀ = 1.8 x10⁻⁸ M).

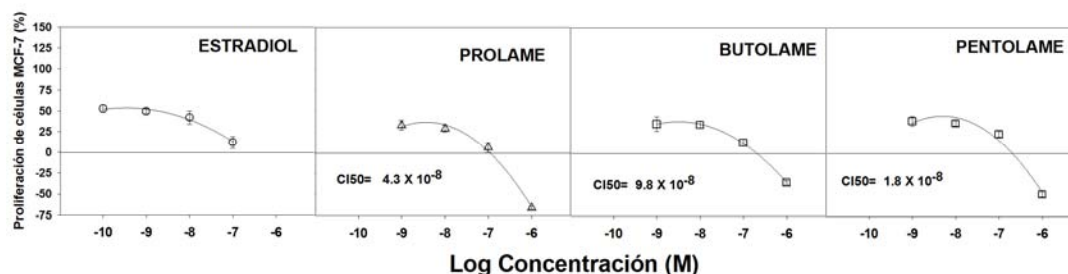


Figura 12. Fase inhibitoria en condiciones no estrogénicas de E₂ y AEs (medio DMEM sin rojo fenol y suplementado con 10% SFB C/D). Los porcentajes de proliferación representan el valor promedio ± EE de tres experimentos independientes.

4.4 COMPARACIÓN DE PARÁMETROS FARMACODINÁMICOS EN LAS DOS CONDICIONES DE CULTIVO.

El efecto proliferativo máximo (%EPmáx) del E₂ fue casi tres veces mayor en condiciones estrogénicas (179 %) que en las no estrogénicas (64 %), lo que sugiere que la presencia de diversos componentes del suero potencian notablemente la eficacia del E₂. En contraste, el %EPmáx producido por los AEs fue similar en ambas condiciones.

Los valores relativos de eficacia de los AEs con respecto a E₂, (%EPR) fueron sustancialmente distintos debido a las diferencias de %EPmáx del E₂, para cada una de las condiciones. Esto no permite establecer una equivalencia comparativa entre los parámetros de eficacia de los AEs calculados en cada una de las condiciones.

En condiciones estrogénicas, los AEs tuvieron %EPRs menores (aproximadamente del 25 %), que los observados en condiciones no estrogénicas (66 %). Es decir que la eficacia relativa de los AEs es 2.5 veces mayor en condiciones no estrogénicas que en condiciones estrogénicas.

Tabla V. Comparación entre condiciones estrogénicas y no estrogénicas.

Compuesto	% EPmáx		(% EPR		CE ₅₀		(% PPR	
	Estrogénicas	No Estrogénicas	Estrogénicas	No Estrogénicas	Estrogénicas	No Estrogénicas	Estrogénicas	No Estrogénicas
Estradiol	179	64	100	100	5.7x10 ⁻¹²	5.5x10 ⁻¹³	100	100
Prolame	48	41	27	64	3.5x10 ⁻¹¹	5.4x10 ⁻¹²	17	10
Butolame	47	44	26	69	3.8x10 ⁻¹¹	4.1x10 ⁻¹²	15	13
Pentolame	46	42	26	65	3.7x10 ⁻¹¹	7.0x10 ⁻¹²	16	8

Parámetros farmacodinámicos del efecto de estradiol y los aminoestrógenos en células MCF-7.

Con respecto a la potencia, en condiciones no estrogénicas se observaron los efectos de E₂ desde concentraciones mucho menores (10⁻¹⁵ M) que las observadas en concentraciones estrogénicas (10⁻¹² M). Esto podría deberse a que en ausencia de sustancias estrogénicas, el E₂ no compite con otras sustancias por la ocupación de sus receptores.

Las CE₅₀ en condiciones no estrogénicas fueron 10 veces menores que las observadas en condiciones estrogénicas. Sin embargo la magnitud de las PPR de los AEs, guardaron proporción con el E₂ en las dos condiciones experimentales. Al igual que la eficacia relativa, en la potencia relativa tampoco podemos establecer una equivalencia comparativa entre los parámetros de cada condición.

Por otra parte, en la fase de inhibición de la proliferación, los resultados en condiciones estrogénicas fueron inconsistentes (ver inciso 4.2), ya que a menor concentración hubo mayor inhibición (tabla VI). Así mismo, en condiciones no estrogénicas, a la concentración de 10⁻⁷ M, las células proliferaron por arriba del control, mientras que a la concentración de 10⁻⁶ M, la magnitud de la inhibición fue mayor que la observada en condiciones estrogénicas.

Tabla VI. Porcentaje del efecto proliferativo de E₂ y los AEs sobre la proliferación de células MCF-7 a las concentraciones de 10⁻⁷ M y 10⁻⁶ M en condiciones estrogénicas y no estrogénicas.

Compuesto	Condiciones estrogénicas.			Condiciones no estrogénicas		
	Proliferación (% a 10 ⁻⁷ M)	Proliferación (% a 10 ⁻⁶ M)	CI ₅₀	Proliferación (% a 10 ⁻⁷ M)	Proliferación (% a 10 ⁻⁶ M)	CI ₅₀
Estradiol	79	-	-	12	-	-
Prolame	-1	-23	2.8 x10 ⁻⁸	6.5	-65.7	4.3 x10 ⁻⁸
Butolame	-59	-39	3.2 x10 ⁻⁸	13.0	-35.0	9.8 x10 ⁻⁸
Pentolame	-55	-33	3.4 x10 ⁻⁸	23.2	-49.0	1.8 x10 ⁻⁸

Los valores con valor negativo representan la inhibición del crecimiento con respecto al control. Concentración Inhibitoria 50 (CI₅₀) que se extrapola de la curva concentración respuesta de las figuras 10 y 12.

4.5 ESTANDARIZACIÓN DEL EFECTO DEL E₂ Y AEs SOBRE LA INDUCCIÓN A LA FASE S DEL CICLO CELULAR.

En la figura 13A se muestra el histograma de las células asincrónicas en medio suplementado con 10% de SFB C/D, donde se observa que el porcentaje de células en la fase G1 es del 64% y el porcentaje de células en fase S es del 30%. Para evaluar los efectos estrogénicos de los compuestos en la inducción de la síntesis de DNA (entrada de las células a la fase S), las células fueron

sincronizadas en la fase G1 (arresto celular G1) en el medio de arresto como se describe en el inciso 2.3. En esta condición, aumentó el porcentaje de células en la fase G1 a 93 % y disminuyó en porcentaje en fase S a 6% (figura 13 B). Después del arresto, las células fueron lavadas con medio e incubadas en condiciones no estrogénicas por 24 y 48 horas (figura 13 C y D respectivamente). En el caso de las células control se observó que, a las 24 horas después del arresto, el porcentaje de células en fase S se incrementó a 8%, mientras que a las 48 horas llegó a 14%. Para calcular la eficacia de los compuestos, se comparó el porcentaje de la fase S de células tratadas menos el porcentaje de la fase S de células control para cada tiempo (ver tabla VI).

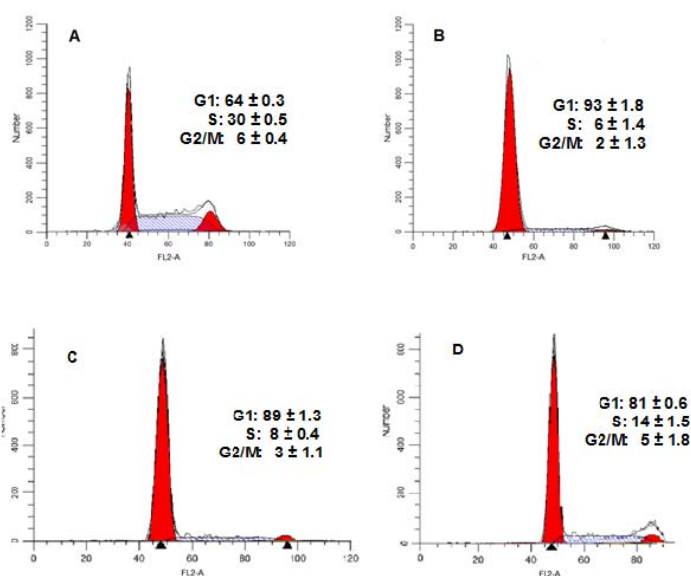


Figura 13. Estandarización de condiciones para la sincronización de células MCF-7 en fase G1. (A) Células asincrónicas crecidas en medio DMEM con rojo fenol y 10% de SFB por 12 horas; (B) células arrestadas con medio DMEM sin rojo fenol, 0.5% SFB C/D y 10 nM de ICI 182, 780 por 12 horas; (C) células incubadas durante 24 horas en condiciones no estrogénicas en medio DMEM sin rojo fenol y 10% SFB C/D después del arresto en G1; y (D) células incubadas durante 48 horas en condiciones no estrogénicas en medio DMEM sin rojo fenol y 10% SFB C/D después del arresto en G1. Los porcentajes de cada fase representan el valor promedio ± EE de tres experimentos independientes.

4.6 EFECTO DEL E₂ Y AEs SOBRE LA FASE S DEL CICLO CELULAR A 24 Y 48 HORAS DE EXPOSICIÓN.

En la figura 14 se observan los histogramas que muestran los resultados obtenidos en la distribución del ciclo celular después de 24 y 48 horas de tratamiento con E₂ y los AEs. Para todos los compuestos, se eligieron estos tiempos debido a que el tiempo de duplicación de las células MCF-7 es de aproximadamente de 24 horas y la concentración seleccionada fue de 10⁻¹⁰ M, debido a que esta fue la concentración mínima a la que se observó el efecto proliferativo máximo en los ensayos de MTT.

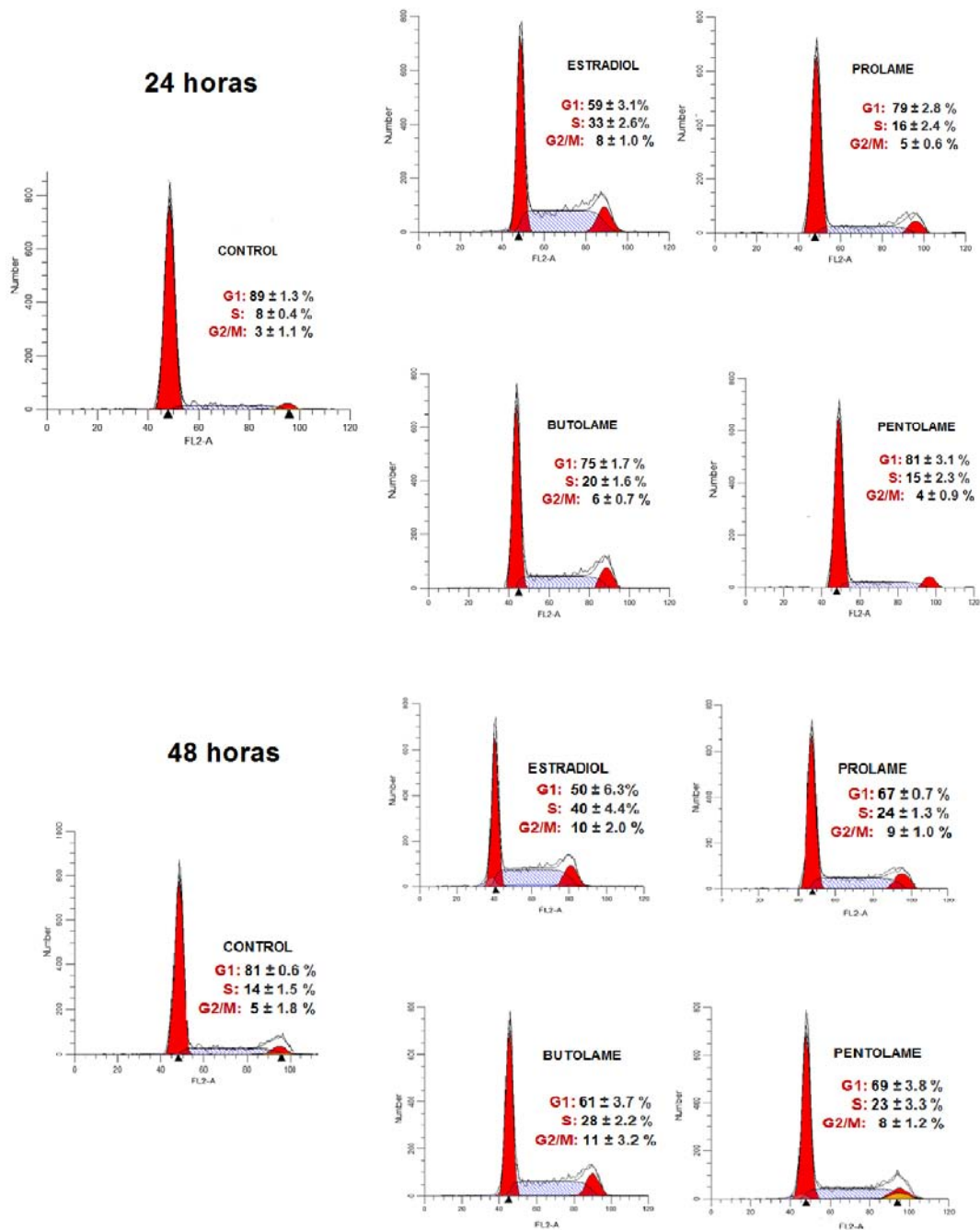


Figura 14. Efecto de E₂ y AEs (10⁻¹⁰ M) en la inducción del ciclo celular de células MCF-7 arrestadas en fase G1. Los histogramas representan el porcentaje de células en cada fase del ciclo celular; a las 24 y 48 horas. Los porcentajes de cada fase representan el valor promedio ± EE de tres experimentos independientes.

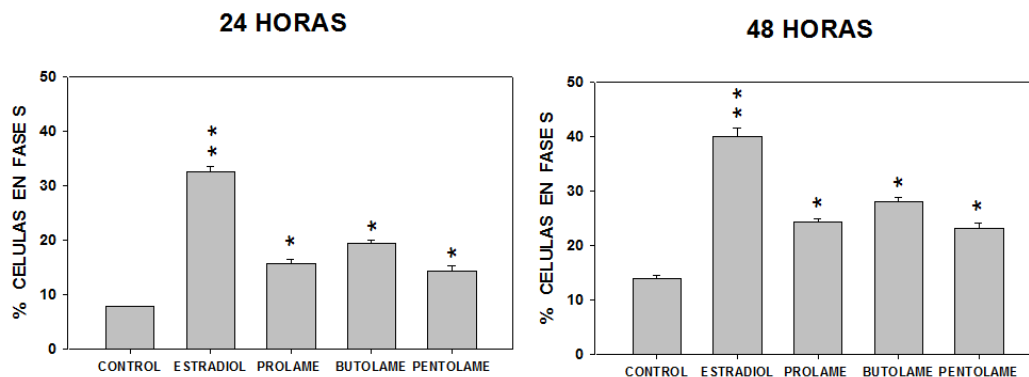


Figura 15. Efecto del E₂ y los AEs prolame, butolame y pentolame sobre la fase S del ciclo celular en células MCF-7. Los histogramas representan el porcentaje de eventos de células individuales en la fase S del ciclo celular a las 24 horas (A) y a las 48 horas de exposición a los compuestos. Los porcentajes de la fase S representan el valor promedio de tres experimentos independientes.*P < 0.05, **P < 0.01.

El E₂ indujo el mayor incremento del porcentaje de células a la fase S del ciclo, que fue del 25 % a las 24 horas y 26% a las 48 horas (ver Figura 15 y tabla VII), es decir que el efecto no aumentó en el tiempo. En contraste, los aminoestrógenos tuvieron efectos menores, pero su magnitud se incrementó a las 48 horas como consecuencia del aumento de células en la fase S del ciclo celular.

Tabla VII. Efecto del E₂ y AEs sobre la inducción de la fase S y la estimación de la eficacia proliferativa relativa (EPR) a las 24 y 48 horas de exposición. Δ (T-C) representa el incremento de la fase S con respecto al control que se obtiene restando el valor del incremento total de cada tratamiento en la fase S (T) al incremento de la fase S del control (C). *P < 0.05, **P < 0.01.

Tratamiento	24 HORAS			48 HORAS		
	FASE S (%)	Δ (T-C) %	EPR (%)	FASE S (%)	Δ (T-C)	EPR (%)
CONTROL	8 ± 0.4	-	-	14 ± 1.5	-	-
ESTRADIOL	33 ± 2.6**	25	100	40 ± 4.4**	26	100
PROLAME	16 ± 2.4*	8	32	24 ± 1.3*	10	38
BUTOLAME	20 ± 1.6*	12	48	28 ± 2.2*	14	54
PENTOLAME	15 ± 2.3*	7	28	23 ± 3.3*	9	35

Los resultados de citometría de flujo (ciclo celular) fueron consistentes con los ensayos de MTT. Los %EPR calculados a las 24 horas fueron de 48 % para

butolame, 32% para prolame y 28 % para pentolame. A las 48 horas, la magnitud de los %EPRs aumentó, pero el orden de eficacia y potencia se mantuvo.

En este modelo, el butolame fue el aminoestrógeno más activo y produjo una eficacia de proliferación relativa (%EPR) del 48 % a las 24 horas y del 54 % a las 48 horas. El prolame tuvo una EPR de 32 % a las 24 horas y del 38 % a las 48 horas, mientras que pentolame fue el compuesto menos activo con un EPR de 28 % a las 24 horas y del 35 % a las 48 horas.

Aunque los aminoestrógenos tuvieron un mayor efecto a las 48 horas, el cálculo de la eficacia en este sistema es más representativo a las 24 horas porque tiene menos variabilidad.

4.7 EFECTO DEL E₂ Y DE LOS AEs SOBRE LA EXPRESIÓN DE LA CICLINA D1 EN CÉLULAS MCF-7.

Mediante ensayos de PCR en tiempo real (RT-PCR) se cuantificó la expresión del gen CCND1 que codifica para la Ciclina D1 en células MCF-7. Se eligió la concentración de 10⁻¹⁰ M para todos los compuestos, debido a que en esta concentración se observó un efecto máximo proliferativo en los ensayos de MTT. El curso temporal se determinó a través de una cinética a las 3, 6, 9, 12 y 24 horas de exposición a la concentración de 10⁻¹⁰ (figura 16).

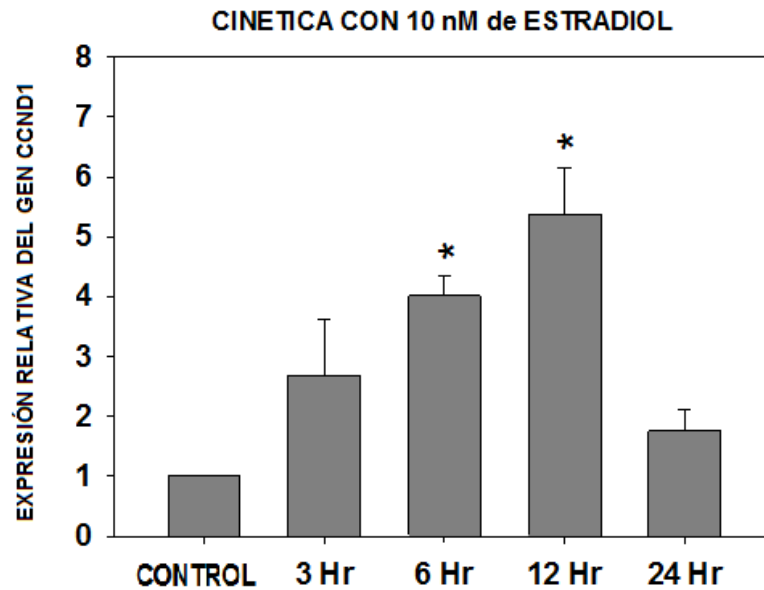


Figura 16. Expresión del gen para ciclina D1 inducida a 3, 6, 12 y 24 horas de exposición a E_2 (10^{-10} M) en condiciones no estrogénicas. El gen de la GAPDH se utilizó como gen de referencia para calcular la $\Delta\Delta Ct$. Diferencias significativas en relación con control * $P < 0.05$.

En la figura 16 se observa que el E_2 aumentó la expresión del gen *CCND1* con respecto a las células control en los diferentes tiempos de incubación de la siguiente manera: A las 3 horas se observó un incremento de 2.7 veces, sin embargo, los datos tuvieron mayor dispersión (± 1.1 E.E.) que no alcanzó significancia estadística con respecto al control. Después de 6 horas se incrementó significativamente 4 veces, a las 12 horas el incremento fue de 5.4 veces con significancia estadística, pero a las 24 horas disminuyó a 1.8 veces.

Esta disminución de la expresión del gen *CCND1* a las 24 horas puede ser el resultado de la disminución del número de células en las fases G1 y S, lo que en consecuencia disminuye la expresión de la ciclina D1.

Debido a que la dispersión de los datos fue menor a las 6 horas de incubación con E_2 , este tiempo fue seleccionado para evaluar la expresión del gen *CCND1* inducido por los AEs.

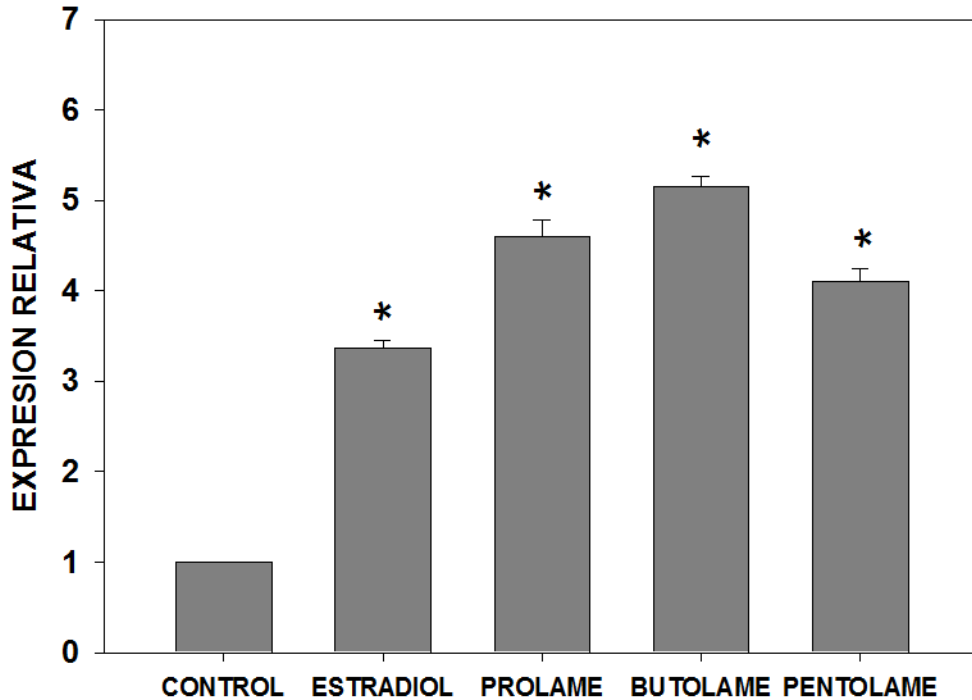


Figura 17. Expresión del gen para ciclina D1 inducido a las 6 horas de exposición a E₂ o a prolame, butolame o pentolame (10⁻¹⁰ M). El gen de la GAPDH se utilizó como gen de referencia para calcular la $\Delta\Delta CT$. En condiciones no estrogénicas, el E₂ y los AEs aumentaron significativamente la expresión del gen de la ciclina D1. Diferencias significativas en relación con control. * P < 0.05.

En la figura 17 se observa que el E₂ incrementó significativamente 3.4 veces la expresión del gen *CCND1* con respecto a las células control. Los tres aminoestrógenos incrementaron significativamente la expresión de este gen con respecto al control de la siguiente manera: prolame 4.6 veces, butolame 5.2 veces, y pentolame 4.1 veces.

Los aminoestrógenos tuvieron una mayor inducción significativa del gen *CCND1* que la que se obtuvo con el E₂.

5. DISCUSIÓN

Los ensayos *in vitro* de proliferación de células MCF-7 de carcinoma mamario humano son los más utilizados para determinar las propiedades estrogénicas de compuestos (Wang et al, 2012). Este ensayo también es un indicador del efecto de xenobióticos en el crecimiento de tumores dependientes de estrógeno, que es un efecto adverso grave de los estrógenos utilizados en la TRH.

En condiciones no estrogénicas se observó que los valores de las respuestas tenían una mejor correspondencia con las curvas concentración respuesta, tanto en la fase de aumento proliferativo, como en la fase de inhibición.

La magnitud de eficacia proliferativa del E₂ en condiciones no estrogénicas (64 %) fue casi tres veces menor que la observada en condiciones estrogénicas (179 %). En contraste la eficacia de los aminoestrógenos fue similar en las dos condiciones experimentales.

La mayor magnitud en la respuesta proliferativa en condiciones estrogénicas puede deberse a que el ER- α activado por el E₂ interactúa y activa a los receptores de crecimiento con actividad tirosina cinasa como el IGF-1R y se activan las vías de señalización intracelulares como la PI3K/AKT y la MAPK, estas vías pueden fosforilar al RE- α libre de ligando y a sus co-reguladores aumentando su actividad transcripcional, lo que resulta en la expresión de más factores de crecimiento y sus ligandos (Gaben et al, 2012), esta cooperación entre las vías del ER- α y las de RTK potencian la capacidad proliferativa de las células MCF-7.

En tanto que los resultados semejantes en proliferación obtenidos con los AEs tanto en condiciones no estrogénicas como en estrogénicas sugieren que en esta última condición, la activación del ER- α por los AEs, no provocan la interacción ni la activación de RTKs y por lo tanto, no hay potenciación de la proliferación.

Las CE₅₀ en condiciones estrogénicas fue 10 veces mayor a las obtenidas en condiciones no estrogénicas. Por estas razones los valores de eficacia y potencia relativa de los AEs en cada condición no son equiparables. Sin embargo, sus parámetros farmacodinámicos son más claros y evidentes en las condiciones no estrogénicas.

Los ensayos de proliferación por MTT son útiles para identificar compuestos con actividad estrogénica y es una prueba que permitió determinar los parámetros farmacodinámicos (%EPmáx, %EPR, CE50 y %PPR) de la serie de compuestos homólogos prolame, butolame y pentolame del presente trabajo.

Se determinó que en las condiciones no estrogénicas, el AE con mayor potencia proliferativa fue el butolame (13%), seguido del prolame (10 %) y finalmente el pentolame (8 %). El butolame también fue el más eficaz (69 %), pero no se observaron diferencias en las EPR de prolame y pentolame (64 y 65 % respectivamente).

En estos bioensayos la respuesta proliferativa solo se observa después de 6 días de exposición. A partir de la información generada, se evaluó la eficacia a través de ensayos más específicos a tiempos más cortos donde si se observan diferencias significativas entre la eficacia de los tres AEs.

En citometría de flujo las diferencias observadas entre los grupos tratados alcanzaron significancia estadística (con respecto al control). El orden de eficacia para inducir la fase S del ciclo celular fue semejante al obtenido de las potencias proliferativas: butolame>prolame>pentolame.

Estos resultados fueron consistentes con la expresión del gen *CCND1*. Inesperadamente, la respuesta de los AEs fue mayor que la observada con E₂. Por el corto tiempo en que se observa la respuesta, los resultados sugieren que el mayor efecto de los aminoestrógenos en la síntesis de RNA, podría ser consecuencia de acciones no genómicas.

La señalización rápida no genómica del E₂ es mediada por receptores que se encuentran en o anclados a la membrana plasmática. En células MCF-7 se encuentran anclados a la membrana una subpoblación del ER- α (ER- α 66) y su isoforma ER- α 36. También se encuentra el receptor de estrógeno de membrana EPR30. La activación de estos receptores por el E₂ causa la activación de las vías de señalización rápidas como la MAP, y la PI3K/AKT las cuales son importantes en la inducción de la proliferación (Zhiang et al. 2012, Chaudhri et al. 2012).

De acuerdo a los resultados de este estudio, los AEs podrían utilizar uno o varios de estos mecanismos para la inducción de la expresión del gen *CCND1* con mayor

velocidad que el E₂ en células MCF-7, se requieren más estudios para conocer dichos mecanismos.

El cambio del grupo OH en el carbono 17 β de la molécula del E₂ por una cadena lateral amino-alcohol en los AEs impacta sobre su actividad biológica cambiando sus propiedades sobre la coagulación y sus efectos estrogénicos (Lemini et al, 2013).

El %EPR se utiliza para clasificar a las sustancias estrogénicas como agonistas totales cuando inducen una proliferación relativa al E₂ entre 80% y 100%, como agonistas parciales del 25% al 80% o débiles cuando la inducción es de 10% al 25% (Kuch et al, 2010). De acuerdo con esta clasificación, los AEs tienen un patrón de actividad como agonistas parciales.

La clasificación obtenida en este estudio de los AEs como agonistas parciales está de acuerdo con estudios previos donde se demostró que los 17- β aminoestrógenos prolame, butolame y pentolame son agonistas parciales del ER- α y del ER- β con baja afinidad y baja potencia en relación a la hormona de referencia E₂ (Lemus et al, 1998; Jaimez et al, 2000).

En otros ensayos biológicos, como el modelo *in vivo* de ratones hembra inmaduras y en modelos *in vitro* de transfección en células Hela, la magnitud de efecto de los AEs tuvo el siguiente orden prolame>butolame>pentolame (Lemni 2000). En ratas ovariectomizadas también se observó que el prolame tuvo un efecto mayor que el butolame en la disminución de la LH en suero (Jaimez et al, 2000).

En contraste, nuestros resultados indican que en la proliferación de células MCF-7, el butolame es el compuesto con mayor potencia y eficacia.

Estos resultados indican que la actividad estrogénica *in vitro* en células tumorales del pentolame es menor que la del prolame y del butolame. Esto hace pensar que el pentolame podría ser un compuesto más seguro en mujeres con predisposición a cáncer de mama, por lo que el compuesto podría ser objeto de estudios posteriores.

6. CONCLUSIONES

En el presente trabajo se evaluó el potencial proliferativo de los aminoestrógenos prolame, butolame y pentolame en el crecimiento de células MCF7 de cáncer mamario humano.

Tanto en condiciones estrogénicas como no estrogénicas, el E₂ y los AEs mostraron comportamiento bifásico en la proliferación que se observa en las curvas concentración-respuesta. La actividad de los AEs fue similar en las dos condiciones, mientras que la de E₂ fue significativamente mayor en condiciones estrogénicas que en las no estrogénicas.

En las condiciones no estrogénicas hay menor variabilidad e interacciones que permiten evaluar con mayor precisión los parámetros farmacodinámicos de compuestos similares como es el caso de los AEs.

En estos ensayos, la respuesta proliferativa sólo se observa a partir de los 6 días de exposición, mientras que en los ensayos por citometría de flujo se observa desde las 24 horas y por PCR en tiempo real desde las 6 horas de exposición.

Los resultados de los tres distintos tipos de ensayos fueron consistentes entre sí, pero sólo la entrada a la fase S del ciclo celular y la expresión de la ciclina D1 tuvieron diferencias estadísticamente significativas con respecto al control.

El corto tiempo en que se observan estos dos últimos efectos, sugiere que los 17 β -aminoestrógenos inducen mecanismos no genómicos que impactan en la proliferación.

En cuanto a la potencia, la magnitud de la respuesta de los AEs fue aproximadamente 10 veces menor a la del E₂, siguiendo el mismo orden de actividad que se observó con la eficacia.

En otros modelos biológicos, como en ensayos de unión al receptor, en el crecimiento uterino y en la disminución sérica de la LH, el prolame tiene mayores efectos estrogénicos que el butolame y el pentolame. Sin embargo, en los tres distintos tipos de ensayos realizados con células MCF-7, el AE más activo y más potente fue el butolame y el menos activo fue el pentolame.5523148863.

Por lo anterior el pentolame podría tener menores efectos adversos en mujeres con riesgo de tumores malignos. Dado que no se conoce si la actividad estrogénica los AEs puede inducir efectos secundarios, es necesario llevar a cabo estudios toxicológicos de estos compuestos para identificar sus posibles efectos en humanos y su potencial terapéutico para prevenir o mejorar los síntomas posmenopáusicos y enfermedades inducidas por la deficiencia de estrógenos.

7. BIBLIOGRAFÍA

Acconcia F. and Marino M. The effects of 17 β -estradiol in cancer are mediated by estrogen receptor signaling at the plasma membrane. *Front. Physiol.* 2011; 39 (1): 48-61.

Adams J. et al. Elevated PI3K signaling drives multiple breast cancer subtypes. *Oncotarget* 2011; 2: 435–47.

Albanito L. et al. G protein-coupled receptor 30 (GPR30) mediates gene expression changes and growth response to 17 beta-estradiol and selective GPR30 ligand G-1 in ovarian cancer cells. *Cancer Res.* 2007; 67: 1859–66.

Alexander S. et al. Guide to receptors and channels (GRAC), 5th edition. *Br. J. Pharmacol.* 2011; 164: S1–S324.

Alexander S. et al. Guide to Receptors and Channels (GRAC), 4th Edition. *Br J Pharmacol.* 2009; 158: S1–S239.

Anderson G. et al. Women's health initiative steering committee. Effects of conjugated equine estrogen in postmenopausal women with hysterectomy: the Women's health initiative randomized controlled trial. *JAMA* 2004; 291: 1701–12.

Ariazi A. et al. The G protein-coupled receptor GPR30 inhibits proliferation of estrogen receptor-positive breast cancer cells. *Cancer Res.* 2010; 70: 1184-94.

Ascenzi P. et al. Structure-function relationship of estrogen receptor α and β : impact on human health. *Mol. Aspects Med.* 2006; 27: 299–402.

Bagot C. et al. The effect of estrone on thrombin generation may explain the different thrombotic risk between oral and transdermal hormone replacement therapy. *J Thromb Haemost.* 2010; 8(8): 1736–1744.

Blondon M. et al. Differential associations of oral estradiol and conjugated equine estrogen with hemostatic biomarkers. *J Thromb Haemost.* 2014; 12(6): 879–886.

Bologa C. et al. "Virtual and biomolecular screening converge on a selective agonist for GPR30," *Nat Chem Biol.* 2006; 2(4): 207–212.

Brailoiu E. et al. Distribution and characterization of estrogen receptor G protein-coupled receptor 30 in the rat central nervous system. *J Endocrinol.* 2007; 193: 311–321.

Burger L. et al. Regulation of gonadotropin subunit gene transcription. *J Mol Endocrinol.* 2004; 33(3): 559-84.

Center for Disease Control and Prevention (CDC). US medical eligibility criteria for contraceptive use. *MMWR Recomm Rep.* 2010; 59 (RR-4):1–86.

Cheng S. et al. Retrograde transport of the transmembrane estrogen receptor, G-protein-coupled-receptor-30 (GPR30/GPER) from the plasma membrane towards the nucleus. *Steroids.* 2011; 76: 892–96.

Citri A. et al. EGF-erbB signalling: towards the systems level. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006; 7:505–516. 18.

Cui J. et al. Estrogen synthesis and signaling pathways during ageing: from periphery to brain. *Trends Mol Med.* 2013; 19(3): 197–209.

de Villiers T. et al. Global Consensus Statement on menopausal hormone therapy. *Maturitas.* 2013; 74:391.

Dennis M. et al. Identification of a GPER/GPR30 antagonist with improved estrogen receptor counter selectivity. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2011; 127 (3-5):358-66.

Diamanti-Kandarakis E., Bourguignon J., Giudice L., et al. Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement. *Endocr Rev.* 2009; 30(4):293–342.

Figtree G. et al. Truncated estrogen receptor variant (ER46) in human endothelial cells. *Circulation.* 2003; 107:120–6.

Filardo E. et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR) transactivation by estrogen via the G-protein-coupled receptor, GPR30: a novel signaling pathway with potential significance for breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2002; 80: 231–38.

Filardo E. et al. 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.* 2000; 14: 1649–60.

Filardo E. et al. Activation of the novel estrogen receptor G protein-coupled receptor 30 (GPR30) at the plasma membrane. *Endocrinology.* 2007; 148: 3236–45.

Flouriou et al. Identification of a new isoform of the human estrogen receptor- α (hER- α) that is encoded by distinct transcripts and that is able to repress hER- α activation function 1. *EMBO J.* 2000; 19:4688–4700.

Ford J. et al. GPR30 deficiency causes increased bone mass, mineralization, and growth plate proliferative activity in male mice. *Journal of Bone and Mineral Research.* 2011; 26:298–307.

Fu M, Wang C, Li Z, Sakamaki T, Pestell RG Minireview: Cyclin D1: normal and abnormal functions. *Endocrinology.* 2004; 145: 5439–47.

Funakoshi T. et al. G-protein-coupled receptor 30 is an estrogen receptor in the plasma membrane. *Biochem Biophys Res Comm.* 2006; 346: 904–10.

Gaben A. et al. Ligand-free estrogen receptor activity complements IGF1R to induce the proliferation of the MCF-7 breast cancer cells. *BMC Cancer.* 2012; 12: 291.

García R. et al. Mechanisms of Resistance to Endocrine Therapy in Breast Cancer: Focus on Signaling Pathways, miRNAs and Genetically Based Resistance. *Int J Mol Sci.* 2013; 14(1):108-145.

Gaussem P. et al. Haemostatic effects of a new combined oral contraceptive, norgestrel acetate/17 β -estradiol, compared with those of levonorgestrel/ethinyl estradiol. A double-blind, randomized study. *Thromb Haemost.* 2011; 105(3): 560–7.

Geisler J. et al. Letrozole is superior to anastrozole in suppressing breast cancer tissue and plasma estrogen levels. *Clin Cancer Res.* 2008; 14: 6330–5.

Gewinner C. et al. Evidence that inositol polyphosphate 4-phosphatase type II is a tumor suppressor that inhibits PI3K signaling. *Cancer Cell*. 2009; 16: 115–125.

Giuliano M. et al. Bidirectional Crosstalk between the Estrogen Receptor and Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Signaling Pathways in Breast Cancer: Molecular Basis and Clinical Implications. *Breast Care*. 2013; 8(4): 256:262.

Gjelsvik B. et al. Symptom prevalence during menopause and factors associated with symptoms and menopausal age. Results from the Norwegian Hordaland Women's Cohort study. *Maturitas*. 2011; 70 (4):383-90.

Glidewell-Kenney C. et al. Estrogen receptor alpha signaling pathways differentially regulate gonadotropin subunit gene expression and serum follicle-stimulating hormone in the female mouse. *Endocrinology*. 2008; 149(8): 4168-76.

Graupera M. et al. Angiogenesis selectively requires the p110 alpha isoform of PI3K to control endothelial cell migration. *Nature*. 2008; 453(7195): 662-6.

Gweneg K. et al. Assessment and molecular actions of endocrine-disrupting chemicals that interfere with estrogen receptor pathways. *International Journal of Endocrinology* 2013; 344: 350.

Heldring N. et al. Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets. *Physiol Rev*. 2007; 87: 905–31.

Henson S. et al. Surviving cell death through epidermal grow factor (EGF) signal transduction pathways: implications for cancer therapy. *Cell Signal*. 2006; 18(12): 2089-97.

Herrington D. et al. Effects of estrogen replacement on the progression of coronary-artery atherosclerosis. *N Engl J Med*. 2000; 343:522–9.

Hofmeister M., Damkier H., Christensen B., Olde B., et al. 17 β -Estradiol induces nongenomic effects in renal intercalated cells through G protein-coupled estrogen receptor 1. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2012; 302:F358–68.

Hughes Z. et al. Estrogen receptor neurobiology and its potential for translation into broad spectrum therapeutics for CNS disorders. *Curr Mol Pharmacol*. 2009; 2: 215–236.

Hulley S. et al. Randomized trial of estrogen plus progestin for secondary prevention of coronary heart disease in postmenopausal women. Heart and estrogen/progestin replacement study (HERS) research group. *JAMA*. 1998; 280: 605–13.

Isensee J. et al. Expression pattern of G protein-coupled receptor 30 in Lac Z reporter mice. *Endocrinology*. 2009; 150:1722–30.

Jagannathan V. and Robinson-Rechavi M. Meta-analysis of estrogen response in MCF-7 distinguishes early target genes involved in signaling and cell proliferation from later target genes involved in cell cycle and DNA repair. *BMC Systems Biology*. 2011; 5:138

Jaimez R. et al. In vivo estrogen bioactivities and in vitro estrogen receptor binding and transcriptional activities of anticoagulant synthetic 17 β -aminoestrogens. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2000; 73: 59–66.

Jepsen, K. and Rosenfeld, M. Biological roles and mechanistic actions of co-repressor complexes. *J Cell Sci*. 2002; 115: 689–98.

Kelemen M. et al. Hormone therapy and antioxidant vitamins do not improve endothelial vasodilator function in postmenopausal women with established coronary artery disease: a substudy of the women's angiographic vitamin and estrogen (WAVE) trial. *Atherosclerosis*. 2005; 179: 193–200.

Khalil R. Estrogen, vascular estrogen receptor and hormone therapy in postmenopausal vascular disease. *Biochem Pharmacol*. 2013; 15; 86(12): 1627-42.

Khosla S. et al. Estrogen and the skeleton. *Trends Endocrinol Metab*. 2012; 23 (11): 576–581. Kininis et al. Genomic analyses of transcription factor binding histone acetylation and gene expression reveal mechanistically distinct classes of estrogen-regulated promoters. *Mol. Cell Biol*. 2007; (14): 5090-5104.

Kumar R. et al. The dynamic structure of the estrogen receptor. *J Amino Acids*. 2011; 812540.

Laliberte F. et al. Does the route of administration for estrogen hormone therapy impact the risk of venous thromboembolism? Estradiol transdermal system versus oral estrogen-only hormone therapy. *Menopause*. 2011; 18: 1052–9.

Lappano R. et al. MIBE acts as antagonist ligand of both estrogen receptor α and GPER in breast cancer cells. *Breast Cancer Res*. 2012; 17; 14(1): R12.

Le Romancer M. et al. Cracking the Estrogen Receptor's Posttranslational Code in Breast Tumors. *Endocrine Reviews*. 2011; 32: 597-622.

Lemini C. and Canchola E. Effects of 17β -aminoestrogens on the sexual behavior of female rats. *Physiol Behav*. 2009; 96: 662–6.

Lemini C. et al. Contrasting effects of estradiol and 17β -aminoestrogens on blood clotting time in rats and mice. *Eur J Pharmacol*. 2005a; 510: 229–33.

Lemini C. et al. Estrogenic effects of and analogous effects of 17β -aminoestrogens on uteri of rats and mice. *Eur J Pharmacol*. 2005b; 510: 235–9.

Lemini C. et al. In vivo profile of the anticoagulant effect of 17β -amino-1,3,5(10)estratrien-3-ol. *Eur J Pharmacol*. 2013; 700(1-3): 210-6.

Levin E. Plasma membrane estrogen receptor. *Trends Endocrinol Metab*. 2009; 20: 477-82.

Li L. et al. Plasma membrane localization and function of the estrogen receptor a variant (ER46) in human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003; 100: 4807-12.

Li Y. et al. Regulation of ERR alpha gene expression by estrogen receptor agonists and antagonists in SKBR3 breast cancer cells: differential molecular mechanisms mediated by g protein-coupled receptor GPR30/GPER-1. *Mol Endocrinol*. 2010; 24: 969-80.

Maggiolini M. and Picard D. The unfolding stories of GPR30, a new membrane bound estrogen receptor. *J Endocrinol*. 2010; 204: 105–14.

Manning B. et al. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell*. 2007; 129(7): 1261-74).

Margarido P. et al. Transdermal estrogen therapy effects on fibrinogen levels in women with a past history of venous thromboembolism: a pilot study. *Clin Exp Obstet Gynecol*. 2011; 38: 232–5.

Marino M. et al. Susceptibility of estrogen receptor rapid responses to xenoestrogens: *Physiol Outcomes. Steroids*. 2012; 77: 910–17.

Marino M. et al. S-palmitoylation modulates estrogen receptor alpha localization and functions. *Steroids*. 2006; 71: 298–303.

Meyer M. et al. Dilation of epicardial coronary arteries by the G protein-coupled estrogen receptor agonists G-1 and ICI 182,780. *Pharmacology*. 2010; 86: 58–64.

Miller T. et al. Phosphatidylinositol 3-kinase and antiestrogen resistance in breast cancer. *J Clin Oncol*. 2011; 29:4452–61.

Mo Z. et al. GPR30 as an initiator of tamoxifen resistance in hormone-dependent breast cancer. *Breast Cancer Research*. 2013; 15: R114.

Moore J. et al. Cloning and characterization of human estrogen receptor beta isoforms. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998; 247: 75-8.

Morissette M. et al. Contribution of estrogen receptors α and β to the effects of estradiol in the brain. *J. SteroidBiochem.Mol.Biol*. 2008; 108: 327–38.

Naciff J. et al. Uterine Temporal Response to Acute Exposure to 17 α -Ethinyl Estradiol in the Immature Rat. *Toxicological Sciences*. 2007; 97(2): 467–490.

Nath-Sain S. et al. LKB1 catalytic activity contributes to estrogen receptor alpha signaling. *Mol Biol Cell*. 2009; 20(11): 2785–2795.

Normanno N. et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. *Gene*. 2006; 366(1): 2-16.

O'Malley, B. and Kumar R. Nuclear receptor coregulators in cancer biology. *Cancer Res*. 2009; 69, 8217–22.

Ojeda E. et al. Climacteric symptoms in Quechua and Mestizo women from the Andean region of Cusco, Peru: Effects of altitude and ethnicity. *Maturitas*. 2014; 77(4): 356-60.

Pandey D., et al. Estrogenic GPR30 signalling induces proliferation and migration of breast cancer cells through CTGF. *EMBO Journal*. 2009; 28:523–532.

Post M. et al. Effect of oral and transdermal estrogen replacement therapy on hemostatic variables associated with venous thrombosis: a randomized, placebo-controlled study in postmenopausal women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003; 23(6): 1116–1121.

Poulikakos P. et al. Resistance to MEK inhibitors: should we target upstream?. *Signal*. 2011; 4(166):16.

Prossnitz E. et al. GPR30: a G protein-coupled receptor for estrogen. *Mol Cell Endocrinol*. 2007; 265-266: 138–42.

Prossnitz E. et al. The ins and outs of GPR30: a transmembrane estrogen receptor. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2008; 109: 350–53.

Renoir J. et al. Estrogen receptor signaling as a target for novel breast cancer therapeutics. *Biochem Pharmacol*. 2013; 85(4): 449-65.

Revankar C. et al. A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. *Science*. 2005; 307: 1625–30.

Rosendaal F. et al. Estrogens, progestogens and thrombosis. *J Thromb Haemost*. 2003; 1: 1371–80.

Scott P. et al. Vasorelax action of 17 β -estradiol in rat uterine arteries: role of nitric oxide synthases and estrogen receptors. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007; 293: H3713-9.

Stanley E. et al. Development of methods for the quantitative in vitro analysis of androgen-dependent and autonomous shionogi carcinoma 115 cells. *Cell*. 1977; 10: 35–44.

Steiner A. et al. Unopposed estradiol therapy in postmenopausal women: results from two randomized trials. *Obstet Gynecol.* 2007; 109: 581–7.

Swedenborg E. et al. Regulation of estrogen receptor beta activity and implications in health and disease. *Cell Mol Life Sci.* 2009; 66(24): 3873–94.

Tchaikovski S. and Rosing J. Mechanisms of estrogen-induced venous thromboembolism. *Thromb Res.* 2010; 126 (1): 5–11.

Thomas P. et al. Identity of a membrane estrogen receptor coupled to a G-protein in human breast cancer cells. *Endocrinol.* 2005; 146: 624–32.

van Hylckama V. and Middeldorp S. Hormone therapies and venous thromboembolism: where are we now? *J Thromb Haemost.* 2011; 9 (2): 257-66.

Vanparys C. et al. Performance of the flow cytometric E-screen assay in screening estrogenicity of pure compounds and environmental samples. *Sci Total Environ.* 2010; 408(20): 4451-60.

Vickers M. et al. Main morbidities recorded in the women's international study of long duration oestrogen after menopause (WISDOM): a randomised controlled trial of hormone replacement therapy in postmenopausal women. *BMJ.* 2007; 335: 239–44.

Vivacqua A. et al. GPER mediates the Egr-1 expression induced by 17 β -estradiol and 4-hydroxitamoxifen in breast and endometrial cancer cells. *Breast Cancer Res Treat.* 2012; 133: 1025–35.

Wang Y. et al. Small molecule inhibition of the steroid receptor coactivators: SRC-3 and SRC-1. *Mol Endocrinol.* 2011; 25(12): 2041-53.

Wang Z. et al. A variant of estrogen receptor- α , hER- α 36: transduction of estrogen and antiestrogen-dependent membrane-initiated mitogenic signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006; 103: 9063–8.

Wang Z. et al. Identification, cloning, and expression of human estrogen receptor- α 36, a novel variant of human estrogen receptor- α 66. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005; 336: 1023–7.

Xiao D. et al. Bombesin regulates Cyclin D1 expression through the early growth response protein Egr-1 in prostate cancer cells. *Cancer Res.* 2005; 65: 9934–42.

Yarden Y. and Pines G. The ERBB network: at last, cancer therapy meets systems biology. *Nat. Rev. Cancer.* 2012; 12: 553-563.

Zhang X. et al. A positive feedback loop of ER- α /EGFR promotes malignant growth of ER-negative breast cancer cells. *Oncogene.* 2011; 30: 770–80.