



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**LA EXPRESIÓN DE c-IAP1 Y XIAP DEPENDIENTE DE CORTISOL O DEXAMETASONA
PARTICIPA EN LA PROTECCIÓN CONTRA EL EFECTO CITOTÓXICO DE TNF
EN CÉLULAS MCF7**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

M. en C. IRMA BEATRIZ MITRE AGUILAR

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRAN
COMITÉ TUTOR: DRA. VILMA MALDONADO LAGUNAS

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM
INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA GENÓMICA

COMITÉ TUTOR: DR. ALFONSO LEÓN DEL RÍO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

CD. MX.

JUNIO 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**LA EXPRESIÓN DE α -IAP1 Y XIAP DEPENDIENTE DE CORTISOL O DEXAMETASONA
PARTICIPA EN LA PROTECCIÓN CONTRA EL EFECTO CITOTÓXICO DE TNF
EN CÉLULAS MCF7**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

M. en C. IRMA BEATRIZ MITRE AGUILAR

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRAN
COMITÉ TUTOR: DRA. VILMA MALDONADO LAGUNAS

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM
INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA GENÓMICA

COMITÉ TUTOR: DR. ALFONSO LEÓN DEL RÍO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

MÉXICO, CD. MX.

JUNIO 2019

OFICIO CPCB/615/2019

Asunto: Oficio de Jurado para Examen de Grado.

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM.
P r e s e n t e

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 12 de noviembre del 2018, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** de la alumna **MITRE AGUILAR IRMA BEATRIZ** con número de cuenta **77314208** con la tesis titulada "**LA EXPRESIÓN DE c-IAP1 Y XIAP DEPENDIENTE DE CORTISOL O DEXAMETASONA PARTICIPA EN LA PROTECCIÓN CONTRA EL EFECTO CITOTÓXICO DE TNF EN CÉLULAS MCF7**" realizada bajo la dirección del **DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA**:

Presidente: DRA. LETICIA ROCHA ZAVALETA
Vocal: DRA. REBECA LÓPEZ MARURE
Secretario: DR. ALFONSO LEÓN DEL RÍO
Suplente: DRA. MARCELA LIZANO SOBERÓN
Suplente: DR. JULIO EDUARDO ROQUE MORÁN ANDRADE

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

A T E N T A M E N T E
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 27 de mayo del 2019.



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA
COORDINADOR DEL PROGRAMA



AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), por ser la casa de estudios que me ha formado y me ha brindado la oportunidad de crecer y continuar en el camino de la investigación.

Agradezco especialmente al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por su financiamiento para este proyecto a través de programa de Ciencia Básica 2015 (número 256725). Fui apoyada en mis estudios de doctorado por el programa de Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM con una beca de CONACYT (número 172558). y agradezco también al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación en Innovación Tecnológica (PAPIIT), DGAPA-UNAM (número IV200218).

También agradezco a mi tutor principal el Dr. Alejandro Zentella Dehesa, por su asesoramiento y dirección asertiva durante todo el desarrollo de este proyecto, su conocimiento y experiencia en el tema fueron clave para desarrollarlo. Por hacerme crecer no solo académicamente como investigador sino como persona, como madre y como hija, por su apoyo incondicional, gracias.

Agradezco a los miembros de mi comité tutor, la Dra. Vilma Maldonado Lagunas con su amplio conocimiento en la apoptosis, en las proteínas inhibidoras de la apoptosis etc., por guiarme en la elaboración de mi manuscrito “estado de arte” y en la preparación para la candidatura, por su interés y disponibilidad en todo momento durante el desarrollo de todo el proyecto. Y al Dr. Alfonso León Del Río, por su experiencia en receptores nucleares y en la inhibición de la expresión de proteínas, por su valiosa ayuda y apoyo incondicional.

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

Quiero agradecer a las personas que de una manera u otra colaboraron conmigo para poder llevar a cabo este proyecto.

A la Dra. Nancy Raquel Mejía Domínguez de la Red de Apoyo a la Investigación (RAI-UNAM en el INCMNSZ) por el apoyo académico (materia de estadística) durante la última fase de esta tesis.

Al M. en C. José Luis Ventura Gallegos por su apoyo técnico y académico durante el desarrollo de este trabajo, adscrito al Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Unidad periférica en el departamento de Bioquímica del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”.

Al p. Médico Cirujano Daniel Moreno Mitre por su apoyo técnico y académico. Facultad de Medicina, UNAM. Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”.

Al Ingeniero Químico Eusebio Moreno Ramírez por el invaluable apoyo técnico y académico durante el desarrollo de esta tesis y por su asesoramiento en el análisis de los resultados del xCELLigence. Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”.

Al Dr. Felipe Vilchis-Urbe del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”. y al Dr. Ignacio Camacho-Arroyo de la Facultad de Química, UNAM por donar amablemente el cortisol y el RU486/Mifepristona, respectivamente, para este proyecto.

A la UNAM por el Programa “Academic Writing for Publication” por mi estancia en Ottawa, Canadá y por la ayuda aportada para la escritura de mi artículo.

Al Dr. Rafael Ibarra Contreras por su apoyo académico y su Lluvia de ideas para la escritura de mi artículo. Departamento de idiomas, Facultad de Química, UNAM

DEDICATORIAS

A Dios y a mis padres por darme la vida.

Algún día me propuse ser sobresaliente y hacer una maestría que le dediqué a mi madre Agustinita q.e.p.d. a quien amaré siempre.

Ahora el doctorado trae una nueva etapa a mi vida. Le dedico este trabajo a mi padre Antonio Venancio q.e.p.d. con quien tuve la oportunidad de convivir intensamente los últimos 20 años de su vida y con quien además aprendí de los aspectos clínicos en el tratamiento contra el cáncer, que me hicieron despertar más el interés en mi proyecto y así poder colaborar con un granito de arena.

Durante mi larga vida he sido bendecida por disfrutar de la compañía de seres muy queridos que han sido para mi una chispa de energía que enciende el deseo de seguir adelante, y se llama familia y amigos.

Por supuesto que el premio mayor se lo lleva mi amado esposo Eusebio que ha sido un faro de luz en mi vida. Siempre con sus atinados consejos y comentarios para hacer mejor y mas ligero mi andar por la vida. Estando a su lado no hay imposibles. Gracias Dios por darme un compañero, el mejor!

A mis hijos Daniel y Diana Laura quienes han sido para mi el motivo de seguir adelante para ser el ejemplo de sí se puede! y por supuesto, también para poder llevar a casa un pedazo mas grande de pan. Ellos son para mi un espejo en la vida, me conocen, me miman, pero también me regañan pues me quieren y desean para mi lo mejor, aunque a veces no los entienda.

A mis hermanos Antonio, María de Lourdes y Dalila gracias porque en diferentes etapas de nuestras vidas hemos caminado juntos hasta lograr nuestras metas.

A mis queridas primas Jose, Amparito y Lyda gracias por transmitirme sus consejos y experiencia en la vida, recuerdo cuando de niña convivíamos y yo quería ser como ustedes.

A mis amigas Imelda, Lucy B., Laura, Dely, Vicky, Yvonne, Rosy, Nancy, Rosario, Sara, Gladis, Gaby, Vania, Cynthia, Adelita, Agustina, Nadia, Carmita, Irma, Lucía R., Elizabeth por hacer que la amistad sea siempre motivo de felicidad, consejo y ejemplo gracias por todo su apoyo.

A mis amigos Alejandro Z., Alberto H., Alberto C., Alfonso, Abigail, Adrián, José Luis, Sigi, Román, Carlos porque siempre están allí cuando más los necesito.

Agradezco a todos mis compañeros de la Unidad de Bioquímica, Tere, Alma, Janini, Alex, Anselmo, Betty, Zaira, Martín, David, Adrián, César, Ámbar, Víctor E., Omar, Betty, Pedro, Tere, José Manuel, Mariana, Sra. Manue, porque su compañía siempre ha sido grata y placentera.

A mis alumnos por su apoyo, buen humor y por permitirme crecer juntos, David, Viridiana, Fernanda, Linet, Daen, Saúl, Ximena, Sandra, Marcos, Irais.

Y a todos los que me faltó mencionar...

A todos los quiero, gracias por formar parte de mi vida

i EL ÍNDICE

RESUMEN	13
ABSTRACT	15
ANTECEDENTES	16
INTRODUCCIÓN	18
EL CÁNCER DE MAMA	18
LOS GLUCOCORTICOIDES	21
EL CORTISOL	23
EL RECEPTOR DE GLUCOCORTICOIDES.....	24
LA ESTRUCTURA DEL RECEPTOR DE GLUCOCORTICOIDES	25
LA APOPTOSIS	27
EL TNF.....	28
LAS PROTEÍNAS INHIBIDORAS DE LA APOPTOSIS	30
JUSTIFICACIÓN	32
HIPÓTESIS	32
OBJETIVO GENERAL	33
OBJETIVOS PARTICULARES	33
LA ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	34
I. MATERIALES	35
II. LOS PLÁSMIDOS.....	35
III. EL CULTIVO CELULAR.....	37
IV. EL CURSO TEMPORAL DE VIABILIDAD CELULAR POR TINCIÓN CON CRISTAL VIOLETA.....	37
V. EL ENSAYO DE VIABILIDAD EN TIEMPO REAL POR XCELLIGENCE™	38
VI. EL ENSAYO DEL GEN REPORTERO	39
VII. EL ENSAYO CON RNA DE INTERFERENCIA	39
VIII. EL INMUNOENSAYO TIPO WESTERN BLOT.....	40
IX. LA PCR EN TIEMPO REAL (qRT-PCR)	41
X. EL ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO	42
XI. EL ANÁLISIS ESTADÍSTICO	43
LOS RESULTADOS	44
1 <i>El cortisol y la dexametasona interfieren con la muerte inducida por el TNF en las células MCF7</i>	44
2 <i>El receptor de glucocorticoides participa en la protección conferida por el cortisol y la dexametasona</i>	50
3 <i>La presencia del cortisol y la dexametasona inhibe el procesamiento de PARP1 en células MCF7 tratadas con TNF y sugiere la expresión de un inhibidor de las proteínas de la apoptosis</i>	54
4 <i>El efecto protector del cortisol y la dexametasona mantiene los niveles intracelulares de la c-IAP1 y la XIAP en células MCF7 tratadas con TNF</i>	56
5 <i>El cortisol y la dexametasona inducen un aumento en los niveles de ARNm de la familia IAP en células MCF7 tratadas con TNF</i>	58
6. <i>siRNA contra c-IAP1 y XIAP interfiere con la protección conferida por cortisol o dexametasona</i>	60

DISCUSIÓN	63
CONCLUSIONES	72
BIBLIOGRAFÍA	74

ii EL ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Tasas crudas de mortalidad y proyecciones por las diez principales causas de cáncer en mujeres, 1998-2020.	19
Figura 2. Principales regiones de la glándula mamaria afectadas por el cáncer.	20
Figura 3. Las estructuras de los glucocorticoides y su vía de señalización.	22
Figura 4. Estructura del receptor nuclear.	26
Figura 5. La estructura funcional del receptor de glucocorticoides.	26
Figura 6. Células tumorales MCF7 tratadas con TNF y dexametasona.	29
Figura 7. Los ocho miembros de la familia de las proteínas inhibidoras de la apoptosis y su estructura	30
Figura 8. Diagrama de flujo del diseño experimental.	34
Figura 9. Los vectores pcDNA3.1-GRα y GRE-pGL3-GRE	36
Figura 10. La adición de glucocorticoides ejerce cambios en la proliferación en células MCF7.	44
Figura 11. La dexametasona y el cortisol interfieren con el efecto citotóxico del TNF en células MCF7.	49
Figura 12. Inmunoensayo tipo Western blot para la detección de los receptores nucleares en células de cáncer de mama MCF7 y BT474.	50
Figura 13. La protección anticitotóxica conferida por el cortisol y la dexametasona está mediada por el receptor de glucocorticoides.	53
Figura 14. La muerte en células MCF7 tratadas con TNF se correlaciona con el procesamiento de la Poli ADP-ribosa polimerasa 1 (PARP1).	55
Figura 15. La expresión de los niveles sostenidos de c-IAP1 y de XIAP se asocia al tratamiento con cortisol y con dexametasona durante la protección contra el TNF.	58
Figura 16. Mapa de calor de los niveles de expresión de RNA mensajero del gen del receptor de glucocorticoides NR3C1 y de la familia de genes IAP en respuesta a los distintos tratamientos.	59
Figura 17. La protección contra TNF conferida por glucocorticoides disminuye al interferir con c-IAP1 o XIAP.	62
Figura 18. Expresión del gen del receptor de glucocorticoides (NR3C1) y su coexpresión con otros genes en muestras de pacientes con cáncer de mama empleando la base de datos del Bioportal.	67
Figura 19. Diagrama parcial de la estructura de los promotores de los genes de c-IAP1 y XIAP.	68
Figura 20. Mapa mecanístico del efecto de TNF y glucocorticoides en células MCF7.	73

iii EL ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Los receptores esteroideos pertenecen a los receptores nucleares. [28]	25
Tabla 2. Los ocho genes de la familia de las proteínas inhibidoras de la apoptosis en mamíferos.	31
Tabla 3. Las secuencias de oligonucleótidos utilizados para la qRT-PCR.	42
Tabla 4. Las tasas de cambio en tiempo real.	46
Tabla 5. La ventana de tiempo “a” en el xCELLigence.	47
Tabla 6. Los valores promedio del índice celular normalizado (NCI)	48
Tabla 7. Efecto del agonista parcial RU486 en células MCF7 tratadas con cortisol y dexametasona.	51
Tabla 8. Análisis de la disminución de la protección citotóxica mediante siRNA con c-IAP1 o XIAP presentada en la figura 17c).	62
Tabla 9. Coeficiente de correlación de Pearson de la coexpresión de NR3C1 frente a la familia de genes IAP.	69

iv ABREVIATURAS

BIR: Dominio de repeticiones baculovirales de las proteínas inhibidoras de la apoptosis;
CORT: Cortisol;
c-IAP1: Proteína inhibidora de la apoptosis celular 1;
DEX: Dexametasona;
DUSP1: Inmunoensayo tipo ELISA de fosfatasa 1 de especificidad dual: ensayo inmuno absorbente ligado a enzimas;
ER α : receptor de estrógeno alfa;
ETOH: etanol (vehículo);
FAS: primer receptor de señal de apoptosis;
FBS: suero fetal bovino;
GC: glucocorticoides;
GR: receptor de glucocorticoides;
GRE: elementos de respuesta a glucocorticoides;
HER2: receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano;
IAP: proteína inhibidora de la apoptosis;
IHC: inmunohistoquímica;
MFC7: Michigan Cancer Foundation 7;
NCI: índice celular normalizado;
NR3C1: Gen del receptor nuclear subfamilia 3, grupo C, miembro 1;
NF- κ B: Factor nuclear kappa B;
PARP1: Poli (ADP-ribosa) polimerasa 1;
PR β : Receptor de progesterona beta;
RNAm: Ácido ribonucleico mensajero;
RPMI: Roswell Park Memorial Institute;
RU486: Mifepristona;
SGK1: quinasa regulada por suero/glucocorticoide 1;
siRNA: Ácido ribonucleico interferente pequeño;
TCGA: Atlas del genoma del cáncer;
TNBC: cáncer de mama triple negativo;
TNF: Factor de necrosis tumoral;
XIAP: Proteína inhibidora de la apoptosis ligada al cromosoma X.

RESUMEN

Introducción: La activación del receptor de glucocorticoides (GR) se ha asociado con la supervivencia celular del cáncer de mama *in vitro*. La protección dependiente de los glucocorticoides (GCs) contra la muerte celular inducida por el factor de necrosis tumoral (TNF) se ha caracterizado bien en células de cáncer de mama luminal A MCF7. El GR activa una variedad de mecanismos de protección, como a las proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAPs). Sin embargo, la contribución relativa de la expresión de las IAPs, dependiente del GR en la protección de la muerte celular, no ha sido evaluada. Esta contribución es de relevancia clínica ya que los glucocorticoides sintéticos, particularmente la dexametasona, se incluyen rutinariamente en el tratamiento por quimioterapia para el cáncer de mama para reducir los efectos secundarios, como náuseas, anorexia e hipersensibilidad. Aquí se evaluó si los GCs particularmente el cortisol y la dexametasona interfieren en la muerte celular de las células MCF7 tratadas con TNF y si la c-IAP1 y la XIAP juegan un papel relevante durante este proceso.

Metodología: Se usaron las células MCF7 para todos los experimentos. El GR se activó con el cortisol (CORT) o con la dexametasona (DEX) y se inhibió con la mifepristona (RU486). La viabilidad celular se determinó en tiempo real con el sistema xCELLigence™ RTCA y en los puntos finales específicos se utilizó la tinción de cristal violeta. Los niveles de RNAm de los ocho miembros de la familia IAP se midieron mediante qRT-PCR. Los niveles de la proteína del GR, PR, ER α , HER2, PARP1, c-IAP1 y XIAP se evaluaron mediante el inmunoensayo tipo Western blot. La inhibición de la expresión de c-IAP1 y de XIAP se realizó mediante la transfección transitoria con siRNAs específicos. Se realizó el análisis de la coexpresión entre el RNAm del GR (*NR3C1*) y la de los genes de la familia *IAP* esto se investigó en los datos de transcriptoma de 1100 pacientes con cáncer de mama disponibles en la interfase de la base de datos llamada cBioportal.

Resultados: El RU486 inhibió significativamente el efecto anticitotóxico del cortisol y de la dexametasona. El procesamiento de PARP1 disminuyó en presencia de ambos glucocorticoides. Los tratamientos combinados con GCs + TNF aumentaron los niveles relativos del RNAm de Survivin > c-IAP1 > NAIP > Apollon > XIAP > Ts-IAP > ML-IAP > c-IAP2. Además, el contenido del RNAm de GR aumentó con los tratamientos combinados de GCs + TNF. Se observaron niveles sostenidos de las proteínas c-IAP1 y XIAP después de las 48 h con los tratamientos combinados con GCs + TNF. Con el silenciamiento de los genes *c-IAP1* y *XIAP*, se disminuyó

la protección mediada por el cortisol y por la dexametasona. En el análisis realizado a partir de datos del cBioportal, se determinó que en las muestras de tumores de mama, el RNAm del GR se coexpresó con la IAP Apollon y con la XIAP con un coeficiente de Pearson superior a 0,3.

Conclusiones: El efecto de los glucocorticoides contra la citotoxicidad mediada por el TNF implica una mayor expresión del RNAm y de niveles sostenidos de las proteínas c-IAP1 y XIAP. Los efectos antagonistas del RU486 y los resultados de la qRT-PCR también sugieren que el GR juega un papel importante en el cáncer de mama. Sería recomendable estudiar el papel de transactivación del GR en este proceso para descartar si esta involucrado en la resistencia a la apoptosis y contribuye a una mayor capacidad metastásica. Este hallazgo puede tener implicaciones clínicas porque el GR y las IAPs se expresan en muestras de tumores de mama. Nuestro estudio debería motivar más el análisis sobre la administración de glucocorticoides o anti-glucocorticoides a pacientes con cáncer de mama durante su tratamiento.

ABSTRACT

Background: Glucocorticoid receptor (GR) activation has been associated with breast cancer cell survival *in vitro*. Glucocorticoid (GC)-dependent protection against tumor necrosis factor (TNF)-induced cell death has been well characterized in MCF7 luminal A breast cancer cells. The GR activates a variety of protective mechanisms, such as inhibitors of apoptosis proteins (IAPs). However, the relative contribution of the GR-dependent expression of IAPs in the protection of cell death has not, to our knowledge, been evaluated. This contribution is of clinical relevance since synthetic glucocorticoids, particularly dexamethasone, are routinely included in chemotherapy treatment for breast cancer to reduce side effects such as nausea, anorexia and hypersensitivity. Here, we evaluated whether GCs, particularly cortisol and dexamethasone, interfere in the cell death of MCF7 cells treated with TNF and whether c-IAP1 and XIAP play an important role during this process. **Methods:** MCF7 cells were used for all experiments. GR was activated with cortisol (CORT) or dexamethasone (DEX) and inhibited with mifepristone (RU486). Cell viability was determined in real time with the xCELLigence™ RTCA System and at specific endpoints using crystal violet stain. The mRNA levels of the eight members of the IAP family were measured by qRT-PCR. The protein levels of GR, PR, ER α , HER2, PARP1, c-IAP1 and XIAP were evaluated by Western blot analysis. The knockdown of c-IAP1 and XIAP was accomplished via transient transfection with specific siRNAs. GR activation was verified by a gene reporter assay. Via the cBioportal interphase we queried the mRNA levels of GR and IAPs in breast cancer tumors. **Results:** RU486 significantly inhibited the anti-cytotoxic effect of both glucocorticoids. PARP1 processing was diminished in the presence of both glucocorticoids. The combined treatments of GCs + TNF increased the relative mRNA levels of Survivin > c-IAP1 > NAIP > Apollon > XIAP > Ts-IAP > ML-IAP > c-IAP2. Additionally, GR mRNA content increased with the combined treatments of GCs + TNF. Sustained levels of the proteins c-IAP1 and XIAP were observed after 48 h of the combined treatments with GCs + TNF. With c-IAP1 and XIAP gene silencing, the GC-mediated protection was diminished. In the breast tumor samples, the GR mRNA was coexpressed with Apollon and XIAP with a Pearson coefficient greater than 0.3. **Conclusions:** The effect glucocorticoides against TNF-mediated cytotoxicity involves increased mRNA expression and sustained protein levels of c-IAP1 and XIAP. The antagonist effects of RU486 and the qRT-PCR results also suggest the role of the GR in this process. This finding may have clinical implications because the GR and IAPs are expressed in breast tumor samples.

ANTECEDENTES

La expresión de los receptores hormonales, como el receptor de estrógenos ($ER\alpha$), el receptor de progesterona ($PR\beta$) y el receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2) son biomarcadores clave para el subtipo, el pronóstico y la terapia en el cáncer de mama [1]. Sin embargo, las células de cáncer de mama también expresan a otras familias de receptores hormonales, especialmente a la superfamilia de receptores nucleares como el receptor de los glucocorticoides (GR) [2]. Mediante análisis por inmunohistoquímica (IHC), se ha mostrado la expresión nuclear del receptor de glucocorticoides en tumores de cáncer de mama de todos los subtipos intrínsecos. Sin embargo, los niveles de expresión del receptor de glucocorticoides pueden variar según la expresión del receptor de estrógenos, el de progesterona y el grado del tumor. El valor pronóstico de la expresión de receptor de glucocorticoides sobre otras características clínicas no se ha demostrado [3]. Las pacientes con cáncer de mama están continuamente expuestas a los agonistas del receptor de glucocorticoides, por ejemplo, el cortisol (CORT) que está presente en la sangre de los pacientes con cáncer de mama independientemente de su edad; esto representa un marcado contraste con los niveles de estrógenos [4]. Se ha informado que la desregulación de los ritmos circadianos puede aumentar el tiempo de exposición al cortisol en pacientes con cáncer de mama [5]. Para controlar los efectos secundarios de la quimioterapia, se administran agonistas del receptor de glucocorticoides sintéticos, especialmente dexametasona (DEX) a los pacientes con cáncer de mama [6]. Los agonistas del receptor de glucocorticoides, como cortisol y dexametasona, ejercen efectos pleiotrópicos en el micro entorno del tumor de mama [7]. Debido a la relevancia del cortisol y de la dexametasona en el cáncer, sus efectos sobre la proliferación de células cancerosas y la muerte han sido ampliamente estudiados [8]. Sin embargo, los resultados de estos estudios son un área intensa de debate. Algunos estudios señalan que los glucocorticoides dificultan la proliferación celular [9], mientras que otros indican que los glucocorticoides la inducen [10]. Sin embargo, la evidencia actual sugiere que los glucocorticoides contrarrestan constantemente el efecto de los agentes citotóxicos, lo que reduce la muerte de las células de cáncer de mama [11]. El mecanismo por el cual los glucocorticoides confieren protección contra la muerte celular no se ha dilucidado completamente. Sin embargo diferentes investigadores estudian la relevancia de los glucocorticoides; utilizando RNA interferentes pequeños (siRNA) para inhibir la expresión de la quinasa SGK1 [12] y de la fosfatasa 1 de especificidad dual (DUSP1) [13] se reveló que estas dos enzimas son necesarias para el efecto protector mediado por glucocorticoides. Por otra

parte, el tratamiento con glucocorticoides indujo la regulación a la baja de la expresión dependiente del factor nuclear kappa beta (NF- κ B) y el primer receptor de señal de apoptosis (FAS) [10]. La comprensión actual de la interferencia inducida por los glucocorticoides con la muerte celular está bien documentada en experimentos en los que se utiliza el factor de necrosis tumoral (TNF) para causar la muerte celular [14]. Anteriormente, se estableció que las células MCF7 expresan un inhibidor celular de las proteínas de la apoptosis (IAPs), como la proteína inhibidora de la apoptosis celular-1 (c-IAP1) y la proteína inhibidora de la apoptosis ligada al cromosoma X (XIAP) [15]. El tratamiento con TNF disminuye la expresión de estas dos IAPs, y la dexametasona inhibe esta disminución de manera dependiente de NF- κ B [16]. En este proyecto, probamos si el cortisol protege como lo hace la dexametasona, y a través de siRNA transitorios, evaluamos la participación de cada una de las IAPs: c-IAP1 y XIAP en la interferencia de la muerte celular mediada por los glucocorticoides cortisol y dexametasona en células MCF7 tratadas con TNF.

INTRODUCCIÓN

EL CÁNCER DE MAMA

El cáncer es una enfermedad que se caracteriza por la proliferación descontrolada de células en las que han ocurrido alteraciones en los genes relacionados con el ciclo celular, donde pueden tener lugar tres tipos de cambios: inmortalización, transformación y metástasis [18].

En cuanto a la magnitud actual del cáncer de mama en México, a partir de 2006 ocupa el primer lugar de mortalidad por tumor maligno en las mujeres mayores de 25 años, desplazando de esa posición al cáncer cervicouterino.

En el año 2015 la tasa estandarizada de mortalidad fue de 15.2 por 100 mil mujeres de 25 y más años, lo que representa un incremento del 49.5% en las últimas 2 décadas. El 45% del total se diagnosticaron en estadios III y IV. En México, el cáncer de mama se diagnostica en promedio a los 53 años de edad [19].

En la figura 1 se analizan las tendencias y cambios durante las últimas dos décadas y se hacen proyecciones de la mortalidad por cáncer para el año 2020. Se observa que específicamente el cáncer de mama superará 11 casos por 100 mil [20].

Actualmente el cáncer es uno de los mayores retos en salud pública. Los tumores malignos se han posicionado como primeras causas de mortalidad desde hace varias décadas.

Por su etiología y desarrollo el cáncer de mama es una enfermedad compleja multifactorial que se asocia con una gran variedad de factores de riesgo. Entre estos factores se encuentran: factores hereditarios de 1^{er} orden, el riesgo aumenta cuando lo padece la madre, la hermana o la hija; factores hereditarios de 2^o orden cuando lo padece la abuela, la tía etc.; factores genéticos como mutaciones en los genes *BRCA1* y *BRCA2*; factores hormonales, cuando el lapso de exposición a estrógenos y/o la ventana estrogénica es muy amplia, el riesgo aumenta, por ejemplo, si el primer embarazo a término se tuvo después de los 35 años; o por ausencia de embarazo; en mujeres de raza blanca; menarca antes de los 11 años; menopausia después de los 55 años; si es corta la duración de la lactancia [21] etc.

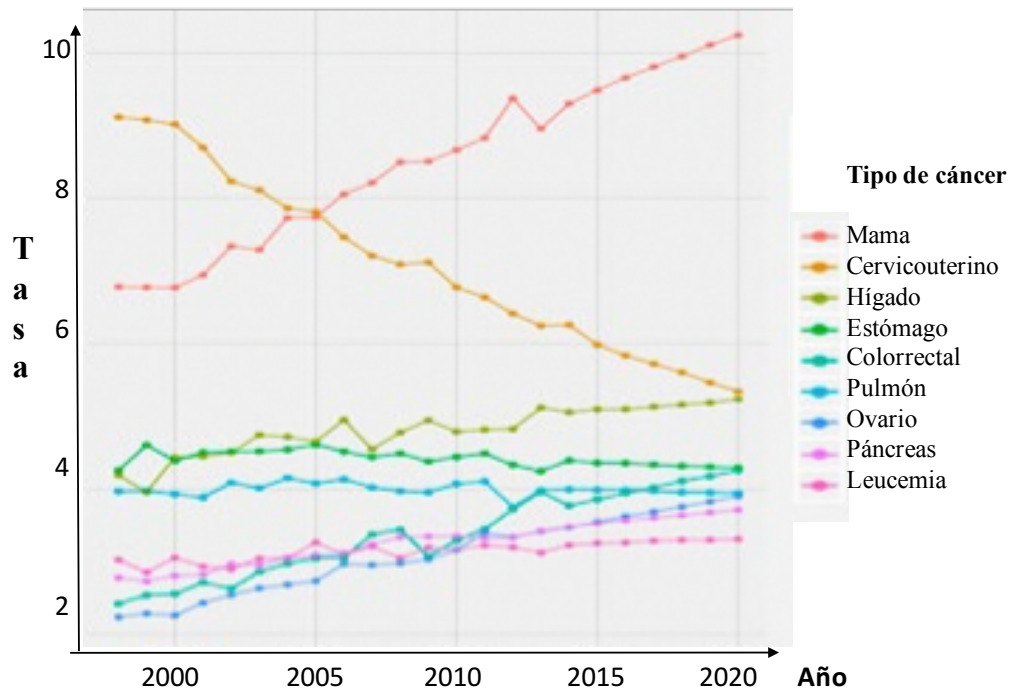


Figura 1. Tasas crudas de mortalidad y proyecciones por las diez principales causas de cáncer en mujeres, 1998-2020.

Desde el año 2006 el cáncer de mama superó al cáncer cérvico uterino y en el 2020 será el de mayor tasa de mortalidad [20].

Factores ambientales como los relacionados con la ubicación geográfica (actualmente la mayor incidencia se observa en los estados del norte del país, el estado de Jalisco y el Distrito Federal); factores del medio ambiente como es la exposición prolongada a la luz ultravioleta del sol o la .exposición a químicos peligrosos que son liberados a la atmósfera por la industria [22], el estatus socio-económico, el estilo de vida, dieta, obesidad, actividad física, consumo de alcohol. Se ha mostrado que el alcohol puede actuar indirectamente a través de su primer metabolito, el acetaldehído, un mutágeno y carcinógeno muy bien caracterizado, que puede actuar como promotor tumoral o bien permitir la activación de pro carcinógenos [21, 23]. El carcinoma ductal in situ (CDIS) es el tipo más común de cáncer de mama no invasivo. Ductal significa que el cáncer comienza dentro de los conductos lácteos como se muestra en la figura 2, carcinoma ductal invasivo o infiltrante (CDI). Otro tipo de cáncer de mama es el carcinoma Lobulillar invasivo (CLI) y el carcinoma Lobulillar no invasivo (CLIS) [24].

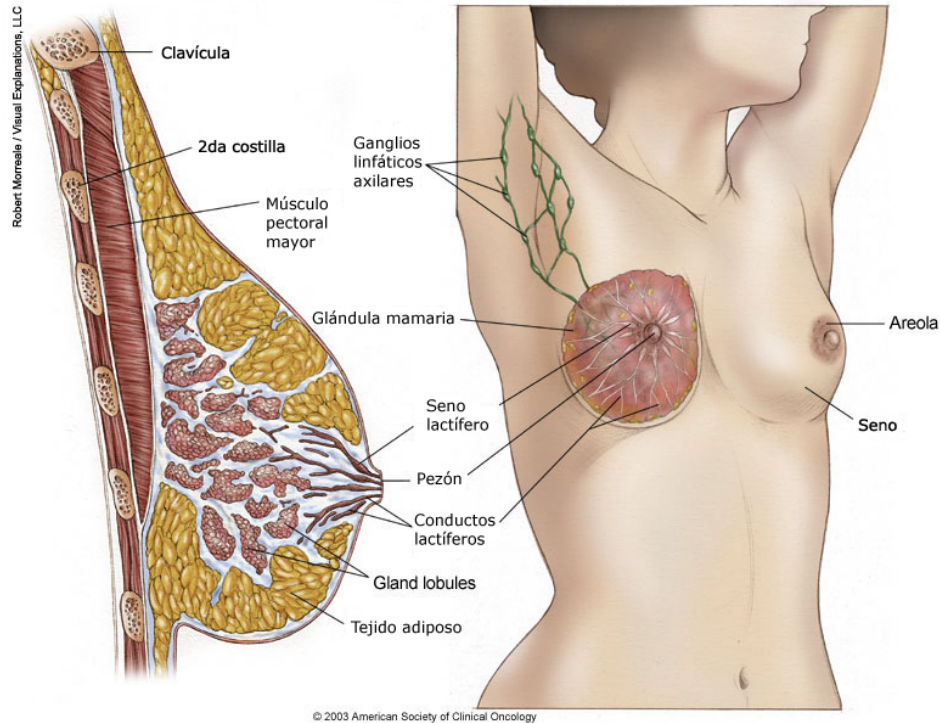


Figura 2. Principales regiones de la glándula mamaria afectadas por el cáncer.

El cáncer de mama se origina generalmente en las células de los lobulillos, que son las glándulas productoras de leche (CDIS), o en los conductos, que son las vías que transportan la leche desde los lobulillos hasta el pezón (CLI) [24].

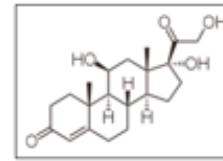
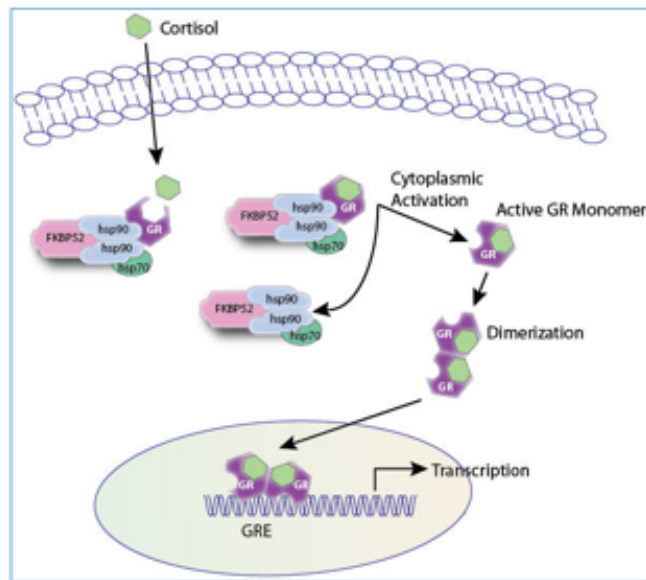
Nuestro conocimiento en la biología del cáncer de mama y nuestra habilidad para poder manipularlo ha crecido exponencialmente en los últimos 20 años. Mucho de esta expansión se ha enfocado en los roles de los esteroides en esta neoplasia. Inicialmente se enfocaba mucho en los receptores de estrógenos y de progesterona pero ahora queremos enfocarnos en el papel que juegan los glucocorticoides y su receptor. Los glucocorticoides son una clase esencial de esteroides que contribuyen significativamente a la regulación esteroideogénica de esta neoplasia. Los glucocorticoides tienen el potencial de desempeñar múltiples funciones en la regulación del cáncer de mama, incluyendo el control de la diferenciación celular, la apoptosis y la proliferación celular. También colaboran en la regulación de los ritmos circadianos y en la respuesta al estrés. Por lo que una mejor comprensión de los glucocorticoides podría ayudar a explicar algunos de los vínculos epidemiológicos entre la alteración circadiana y/o el estrés y el desarrollo de cáncer de mama. Actualmente, los glucocorticoides se usan durante el tratamiento quimioterapéutico en el cáncer de mama. Los resultados de varios estudios sugieren que esto puede tener un impacto adverso en el éxito del tratamiento. He ahí la importancia de estudiarlos como actores durante el tratamiento con glucocorticoides exógenos como

la dexametasona y endógenos como el cortisol durante el cáncer de mama y luego sugerir futuros enfoques esenciales para determinar los roles de los glucocorticoides en esta enfermedad maligna como lo es el cáncer de mama [20].

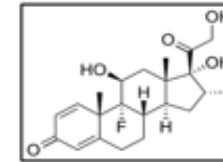
LOS GLUCOCORTICOIDES

Los glucocorticoides pertenecen a la clasificación de compuestos químicos de los corticosteroides y en los humanos son hormonas liberadas por las glándulas suprarrenales. Son esenciales para el funcionamiento normal en la vida, ya que regulan o apoyan a los procesos fisiológicos importantes, como el desarrollo, el metabolismo y la respuesta inmune. En un contexto médico, son agentes antiinflamatorios potentes, lo que resulta en su uso clínico generalizado. De los glucocorticoides endógenos, quizás el más crítico es el cortisol, (figura 3), porque afecta a muchos de los sistemas fisiológicos del cuerpo [25]. Los glucocorticoides son hormonas esteroides responsables de modular el metabolismo básico, la supervivencia celular y la homeostasis, así como las funciones inmunes y neuronales en el humano [39]. El cortisol es el esteroide adrenal más conocido y es más potente que la corticosterona, mientras que los agonistas sintéticos como la dexametasona son más potentes que el cortisol [25].

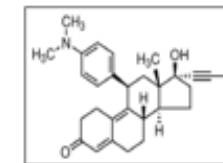
• CORTISOL



Cortisol



Dexametasona



RU486 / Mifepristona

Figura 3. Las estructuras de los glucocorticoides y su vía de señalización. Los glucocorticoides Cortisol, Dexametasona y el antagonista del receptor de glucocorticoides RU486/Mifepristona comparten una estructura similar (anillo ciclopentano).

Los glucocorticoides han sido utilizados durante el tratamiento con quimioterapia contra el cáncer de glándula mamaria, como mediadores de los efectos eméticos. Los glucocorticoides actúan principalmente a través de efectos genómicos unidos a receptores citosólicos. Unidos a la membrana celular se han sugerido la presencia de receptores de glucocorticoides membranales (mGR), aunque algunos efectos de los glucocorticoides son demasiado rápidos para ser mediados por cambios a nivel genómico, las acciones no genómicas aún no están claras. Se ha mostrado la existencia de mGR en monocitos y en células B obtenidas de donantes de sangre sanos utilizando la alta sensibilidad de la tinción inmunofluorescente y se ha concluido que estos receptores mGR pueden reflejar un mecanismo de retroalimentación del organismo tras inmuno estimulación [25]. La mayor parte de la actividad glucocorticoidea está relacionada con la molécula de cortisol (o hidrocortisona), actualmente se dispone de diversas moléculas de glucocorticoides para su uso clínico, la mayoría de origen sintético, con estructuras químicas basadas en los corticoides naturales en las que se introducen cambios que derivan principalmente de las modificaciones que se hacen al anillo D de la molécula de cortisol,

dirigidos a optimizar su potencia antiinflamatoria local, a menudo a través de incrementos en su liposolubilidad, lo que favorece su penetración en los tejidos, y, por otro lado, a reducir la bioviabilidad sistémica y, por lo tanto, a minimizar los efectos adversos [26].

EL CORTISOL

El cortisol es una hormona esteroidea, considerada como un glucocorticoide primario secretado por la corteza suprarrenal humana cuya secreción se encuentra regulada por la hormona ACTH (sintetizada en la hipófisis). El cortisol regula el metabolismo de la glucosa, interviene en el proceso inflamatorio y en la respuesta del organismo al estrés, de modo que bajo condiciones de estrés, el organismo aumenta la concentración de cortisol, lo cual acelera la interrupción de la acción de proteínas que proporcionan el combustible metabólico para mantener funciones del cuerpo.

Algunas de los principales efectos del cortisol en el organismo son: Estimular la gluconeogénesis, disminuir el consumo de glucosa en las células, elevar la glucemia, incrementar los aminoácidos sanguíneos, disminuir el transporte de aminoácidos al interior de las células extra hepáticas e incrementar el transporte hacia las células hepáticas [27].

El cortisol circula en sangre unido a proteínas: un 83% a una proteína específica, la transcortina, y un 12% a la albúmina, el 5% restante circula de forma no unida, que es la responsable de su acción biológica. El 1% del cortisol se elimina por la orina, reflejándose con bastante aproximación la cantidad del mismo que circula libremente por la sangre. Una muestra de sangre tomada a las 8:00 de la mañana contiene una concentración fisiológica de 6 a 23 microgramos por decilitro ($\mu\text{g}/\text{dL}$), mientras que en horarios vespertinos el cortisol oscila entre los 3 y 17 $\mu\text{g}/\text{dL}$. Por otro lado los niveles de cortisol durante el embarazo aumentan en una proporción que oscila entre los 10 y 80 $\mu\text{g}/\text{dL}$ en el día, mientras que en horarios de la tarde oscila entre los 90 y 140 $\mu\text{g}/\text{dL}$ durante la gestación. El entorno fetal puede verse alterado si el estrés de la madre altera su perfil hormonal, y se sabe que hay una relación directa entre los niveles de cortisol materno y fetal [27].

La biosíntesis del cortisol tiene lugar en la capa fascicular de la glándula suprarrenal, tiene una vida media corta de aproximadamente 90 min y tiene un ritmo circadiano [39, 40, 68].

EL RECEPTOR DE GLUCOCORTICOIDES

El receptor de glucocorticoides (GR o GCR) también conocido como receptor nuclear, subfamilia 3, grupo C, miembro 1 (*NR3C1*) pertenece a una superfamilia de receptores nucleares que une ligandos como el cortisol y otros glucocorticoides y es codificado en humanos por el gen *HGNC NR3C1*, situado en el locus cromosómico 5q31.3.

El receptor de glucocorticoides es expresado en casi todas las células del cuerpo humano y regula genes implicados en desarrollo, metabolismo y respuesta inmune. Debido a que el gen del receptor es expresado en diversas isoformas, tiene diferentes efectos (pleiotrópicos) en diferentes partes del cuerpo. El receptor de glucocorticoides puede presentarse en 2 isoformas moleculares diferentes, el GR α y el GR β , con 777 y 742 aminoácidos respectivamente. Ambas isoformas se han encontrado juntas en casi todos los tejidos humanos. El GR α es la isoforma predominante y la única que tiene capacidad para unirse a la hormona y, por lo tanto, para realizar funciones de activación o represión. El GR β se forma por un mecanismo alternativo de maduración (corte y empalme) del pre-RNA mensajero del receptor de glucocorticoides (alternative splicing), y difiere de la isoforma GR α tan sólo en los últimos aminoácidos del extremo C-terminal (o carboxi-terminal). Esta diferencia podría hacer que el GR β fuera incapaz para unirse a la hormona. La posibilidad de que un aumento de la isoforma GR β pudiera actuar como potente inhibidor de la isoforma activa GR α por un mecanismo competitivo, y con ello reducir la eficacia de los glucocorticoides, ha generado un debate científico sobre el peso que la isoforma GR β podría tener realmente en la respuesta clínica a los glucocorticoides. Sin embargo, la disparidad en los datos obtenidos, los diferentes métodos usados y el gran predominio de isoformas GR α respecto a GR β han llevado a poner en duda la repercusión funcional de la isoforma GR β [26].

En ausencia de hormona, el receptor de glucocorticoides se localiza en el citosol formando complejos con diversas proteínas incluyendo la proteína de choque térmico 90 (HSP90), la proteína de choque térmico 70 (HSP 70) o la proteína FKBP52 (proteína 52 de unión FK506). El cortisol, glucocorticoide endógeno hidrofóbico, es capaz de difundir a través de la membrana celular, llegar al citoplasma y así unirse al receptor de glucocorticoides, dando lugar así a la liberación de las proteínas de choque térmico. La unión del ligando cortisol al receptor nuclear de glucocorticoides da como resultado un cambio conformacional en el receptor que, a su vez, activa el receptor, dando como resultado una regulación a la alza (transactivación) o una regulación a la baja (transrepresión) de la expresión génica.

Una propiedad única de los receptores nucleares que los diferencia de otras clases de receptores es su capacidad para interactuar directamente con el DNA genómico y controlar su expresión.

El receptor de glucocorticoide se dimeriza y se transloca al núcleo en donde se une a elementos de respuesta a glucocorticoides (GRE), son lugares de unión al DNA. Los GRE son secuencias palindrómicas de 15 pares de bases (GRE; GGTACAnnnTGTTCT) en donde se lleva a cabo la transcripción de los genes blanco [26].

LA ESTRUCTURA DEL RECEPTOR DE GLUCOCORTICOIDES

El receptor de glucocorticoides pertenece a una superfamilia de receptores nucleares que, además, incluye el receptor de los mineralocorticoide, hormona tiroidea, hormonas sexuales, ácido retinoico y vitamina D.

Grupo	Receptor nuclear	Algún ligando
Receptores Esteroides	Receptor de estrógeno (ER)	17 β -Estradiol
	Receptor de progesterona (PR)	Progesterona
	Receptor de andrógeno (AR)	Testosterona
	Receptor de glucocorticoide (GR)	Hidrocortisona
	Receptor de mineralocorticoide	Aldosterona

Tabla 1. Los receptores esteroideos pertenecen a los receptores nucleares. [28].

Los receptores nucleares poseen de cinco a seis dominios funcionales denominados con letras de la A-F. La región N-terminal o A/B contiene el dominio de activación transcripcional AF-1. La región C consiste en el dominio de unión al DNA (DBD) que es altamente conservado entre los RNs. La región D o “bisagra” conecta al DBD con la región E y además contiene la secuencia de localización nuclear (NLS).

La región E conforma el dominio de unión al ligando o LBD y el segundo dominio de transactivación AF-2. El dominio F está presente sólo en algunos RNs como se muestra en la figura 4. En este compartimento, los receptores nucleares se unen a sus elementos de respuesta a la hormona (HRE) e interactúan con correguladores (CoR) como coactivadores o como correpresores para modular la expresión de sus genes blanco (figura 4) [28, 29].

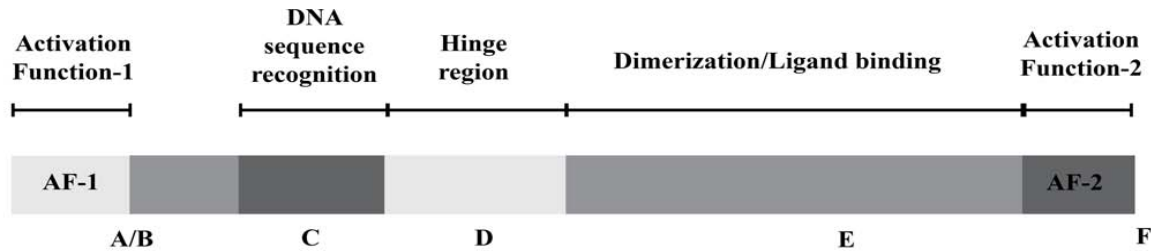


Figura 4. Estructura del receptor nuclear. Las letras de la A a la F representan dominios del receptor nuclear desde el extremo N hasta el extremo C del receptor nuclear, respectivamente [29].

Vía de señalización genómica de los RNs. Los RNs son activados por su ligando específico en el citoplasma. La activación de los RNs conduce a su cambio conformacional, su disociación con proteínas chaperonas (HSP90), dimerización y translocación al núcleo.

Todos estos receptores tienen en común el dominio de unión al DNA, que es una zona central corta, flanqueada por un dominio o extremo N-terminal (o aminoterminal) variable y un extremo C-terminal (o carboxiterminal) relativamente variable (fig. 5). El dominio N-terminal contiene la región AF-1 (o independiente de la hormona), que se ha relacionado con la actividad transcripcional y la unión con proteínas coactivadoras y factores transcripcionales. Por otro lado, el extremo C-terminal contiene la región AF-2, que es responsable de la unión a la hormona [26].

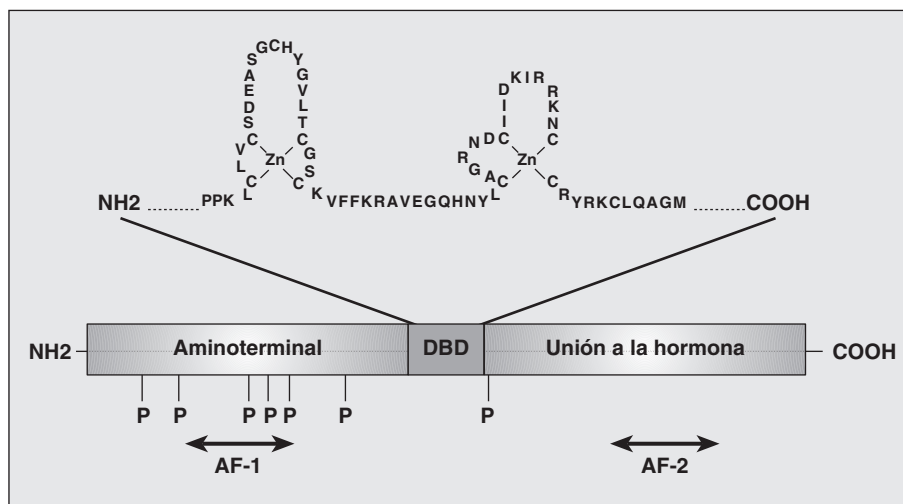


Figura 5. La estructura funcional del receptor de glucocorticoides. La proteína del receptor de glucocorticoides tiene 3 dominios: el aminoterminal, el de unión al DNA (DBD, de DNA binding domain) y el carboxiterminal para unión a la hormona. En la zona central se encuentran los 2 anillos de cinc. También se muestran los lugares de fosforilación, así como las zonas de unión independiente del ligando (AF-1) y de unión dependiente del ligando (AF-2) relacionadas con las funciones de activación transcripcional [26].

Actualmente, numerosos análogos de ligandos de receptores nucleares se utilizan en terapia o se prueban en ensayos clínicos contra diversas enfermedades, como hipertrigliceridemia, aterosclerosis, diabetes, alergias y cáncer, entre otras.

Los glucocorticoides disminuyen la vida media de algunas células inflamatorias como los eosinófilos. La supervivencia de estas células es dependiente de la presencia de citocinas. Los glucocorticoides bloquean la síntesis de estas citocinas, lo que desencadena la muerte programada de estas células, o apoptosis. Sin embargo, el mecanismo molecular de este efecto está aún por dilucidar. Por otro lado, los glucocorticoides prolongan la supervivencia de los neutrófilos y disminuye su apoptosis [26].

LA APOPTOSIS

La apoptosis o muerte celular programada es un mecanismo crucial durante el desarrollo de los organismos, por el cual se eliminan células dañadas o infectadas. La falta de coordinación en el proceso apoptótico se asocia a la aparición de padecimientos como el cáncer [30]. Apoptosis es un término derivado del griego y está conformado por 2 vocablos: **apo** – proveniente de, y **ptosis** – que cae, por lo que de manera genérica hace referencia al evento de caída de hojas y pétalos que presentan plantas y flores [31]. Durante el proceso apoptótico se presentan cambios bioquímicos y morfológicos característicos. Las células apoptóticas tienen una morfología característica: aparición de protuberancias en la membrana, reducción del tamaño celular, condensación nuclear y fragmentación del DNA. Eventualmente la cromatina se compacta en grado extremo y el núcleo termina por desintegrarse.

En la investigación del cáncer, la meta terapéutica es inducir la muerte celular por apoptosis del tumor, bloqueando los factores que la inhiben. Por lo tanto, la regulación de la apoptosis es una estrategia terapéutica importante para el control de las células cancerosas debido a que la resistencia a la apoptosis es muy frecuente en diversos tipos de cáncer. La desregulación de las vías apoptóticas es un factor muy importante en los mecanismos de resistencia a la terapia ya que la mayoría de los fármacos antineoplásicos son inductores directos o indirectos de apoptosis. Debido a que muchas vías de señalización se encuentran desreguladas en células tumorales, la apoptosis puede estar activa en

diversos tipos celulares, sin embargo, las células no pueden morir y adquieren resistencia debido, de manera importante, a la sobreexpresión de proteínas inhibitoras de la apoptosis. Se ha establecido que las vías que limitan la respuesta proliferativa en células normales, como es el caso de la apoptosis, están perturbadas en la mayoría de los tipos de cáncer [31].

EL TNF

El TNF también conocido como caquectina es una citocina de 157 aminoácidos, conformada como heterotrímero en solución. Inicialmente el TNF es una proteína de 26 KDa que al ser hidrolizada por la enzima convertidora de TNF (TACE) da lugar al monómero de 17 KDa. El TNF fue aislado en 1975 a partir del suero de ratones sometidos a tratamiento con endotoxina bacterial. El TNF además es una citocina derivada principalmente de fagocitos mononucleares, linfocitos T y células NK (Natural Killer). En fibroblastos, células de músculo liso y células tumorales, el TNF se expresa en bajas cantidades.

En ciertos tumores el TNF actúa como factor necrótico, de donde deriva su nombre, actúa como factor inflamatorio, estimula la proliferación y la diferenciación celular [23].

El TNF estimula diversas respuestas biológicas: en células tumorales una de las principales señales es que induce la apoptosis. En nuestro modelo celular MCF7 el TNF produce 2 respuestas antagónicas una de muerte por apoptosis y otra de sobrevivencia a través de la activación de NF- κ B como lo muestra la figura 6. Es interesante notar que el TNF puede inducir la muerte celular (con escisión de la caspasa 3 y 8) en células de queratinocitos primarios si carecen de una proteína llamada Sharpin [32].

La importancia de estudiar el TNF en el tratamiento con células de cáncer de mama fue inducir *in vitro* un modelo de la muerte celular por apoptosis como la que se promueve en algunos tratamientos con quimioterapia en pacientes y poder establecer la protección anticitotóxica con cortisol y dexametasona [23].

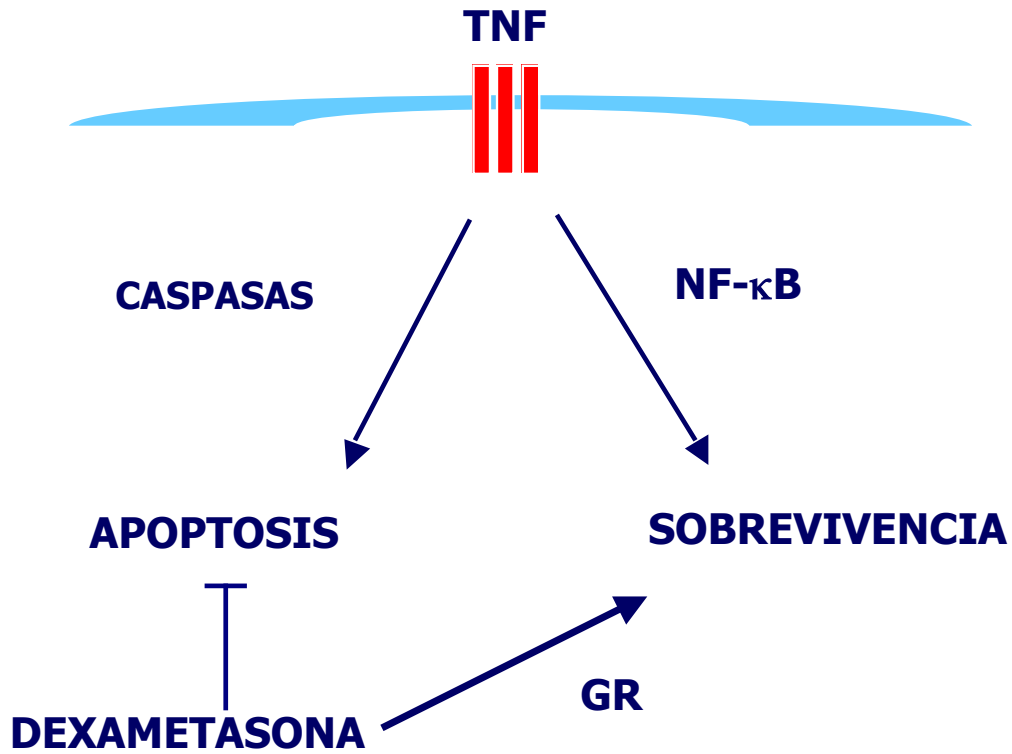


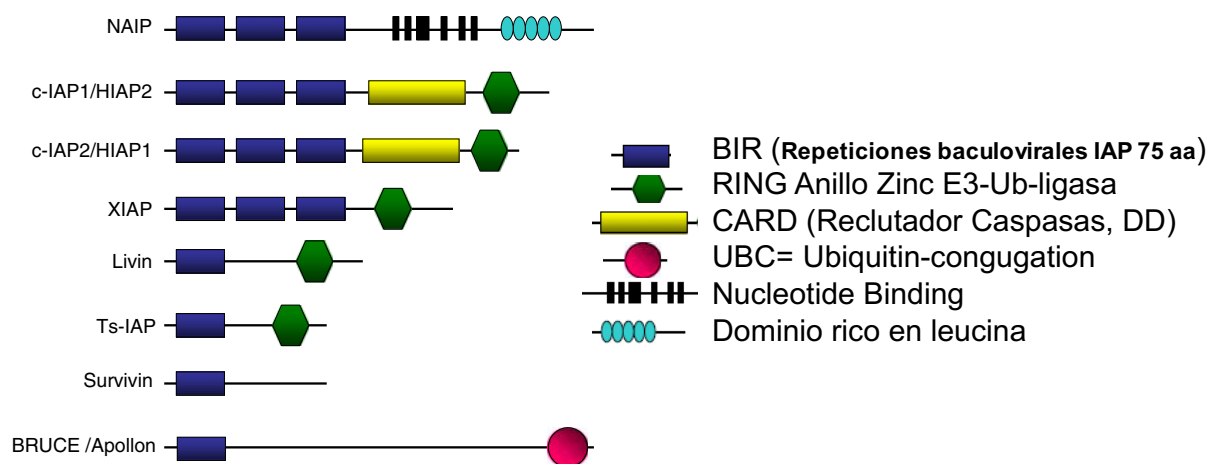
Figura 6. Células tumorales MCF7 tratadas con TNF y dexametasona.

En células MCF7, el TNF estimula dos vías antagónicas una vía de muerte por apoptosis con la activación de las caspasas y una vía de supervivencia con dexametasona, a través de la activación de los factores de transcripción NF-κB y GR.

LAS PROTEÍNAS INHIBIDORAS DE LA APOPTOSIS

Las proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAPs) figura 7a, desempeñan un papel importante en la inhibición de la apoptosis al ejercer su acción sobre las caspasas (proteínas apoptóticas) figura 7b.

LAS IAPs



XIAP

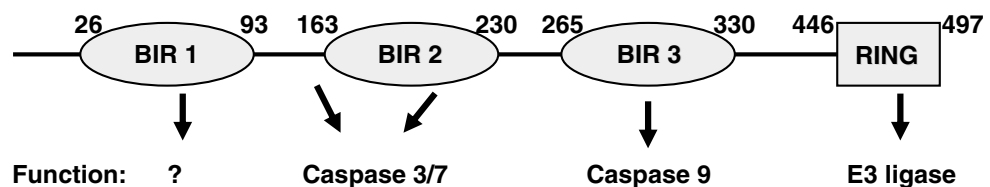


Figura 7. Los ocho miembros de la familia de las proteínas inhibidoras de la apoptosis y su estructura

La familia IAP de mamíferos contiene ocho genes que contienen diferentes dominios. La XIAP mediante su dominio BIR2 y BIR3 se une a las caspasas 3, 7 y 9 respectivamente [33, 34].

Los ocho genes de esta familia se muestran en la tabla 2.

Gen proteína	Sinónimo
<i>BIRC1</i>	NAIP, BIRC, NLRB, neuronal IAP
<i>BIRC2</i>	c-IAP1, IAP2, IAP1 celular
<i>BIRC3</i>	c-IAP2, IAP1, IAP2 celular
<i>BIRC4</i>	XIAP, (ILP1), IAP ligado a cromosoma X
<i>BIRC5</i>	Survivin
<i>BIRC6</i>	Bruce, Apolon
<i>BIRC7</i>	ML-IAP, Livina, melanoma-IAP
<i>BIRC8</i>	(KIAP), hILP-2, Ts-IAP, IAP específica de testículo

Tabla 2. Los ocho genes de la familia de las proteínas inhibidoras de la apoptosis en mamíferos.

La desregulación de las proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAPs) puede impulsar a las células hacia el cáncer y los trastornos neurodegenerativos. Las proteínas inhibidoras de la apoptosis pueden proporcionar un nuevo objetivo para la terapia contra el cáncer. Se pueden desarrollar fármacos que inhiban estas IAPs para inducir la apoptosis en células cancerosas.

JUSTIFICACIÓN

En las células MCF7 tratadas con TNF previo a la muerte, los niveles de c-IAP1 y XIAP disminuyen, sugiriendo que su caída contribuye a un efecto citotóxico causado por el TNF. Dado que el tratamiento adicional con dexametasona correlaciona con niveles sostenidos de c-IAP1 y XIAP, sería importante definir la contribución relativa de estas dos proteínas durante el efecto anticitotóxico mediado por la dexametasona y compararlo contra el cortisol. Hasta el momento se desconocen los mecanismos por los cuales los niveles de XIAP y c-IAP1 disminuyen en respuesta al TNF y cómo es que el cortisol y la dexametasona lo previenen. El efecto de los glucocorticoides en funciones vitales se usa con frecuencia en entornos clínicos para fortalecer a pacientes débiles o terminales. Todos estos efectos están mediados por el receptor de glucocorticoides, que se expresa de forma ubicua, y están relacionados con la activación transcripcional de genes diana para el receptor de glucocorticoides [41-43].

HIPÓTESIS

El cortisol y la dexametasona inhiben el efecto citotóxico inducido por el TNF incrementando los niveles de c-IAP1 y de XIAP.

OBJETIVO GENERAL

Determinar el papel de las proteínas inhibidoras de apoptosis c-IAP1 y XIAP durante la protección anticitotóxica mediada por el cortisol o la dexametasona en células MCF7 tratadas con TNF.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar si el cortisol (glucocorticoide endógeno) tiene el mismo efecto anticitotóxico que la dexametasona (glucocorticoide sintético).
2. Determinar si el efecto anticitotóxico mediado por el cortisol o la dexametasona es vía receptor de glucocorticoides.
3. Determinar si durante el efecto citotóxico por TNF hay procesamiento de PARP1.
4. Determinar la participación de la familia de las proteínas inhibidoras de la apoptosis evaluando sus niveles de RNAmensajero.
5. Determinar la participación de la familia de las proteínas inhibidoras de la apoptosis evaluando los niveles de las proteínas de c-IAP1 y de XIAP.
6. Determinar la importancia de la participación de las proteínas inhibidoras de la apoptosis de c-IAP1 y de XIAP inhibiendo su expresión con RNA de interferencia.

LA ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

La estrategia experimental consistió en dar tratamiento a las células MCF7 con TNF, cortisol, dexametasona y/o RU486 (antagonista de la dexametasona), solos y/o mezclados. En extractos proteicos totales, se analizaron los niveles de c-IAP1 y de XIAP mediante inmunoensayos tipo Western blot, en cDNA se midieron los niveles de RNA mensajero de c-IAP1 y de XIAP mediante la PCR en tiempo real (qRT-PCR). En cultivos celulares se evaluó el efecto citotóxico del TNF y el efecto anticitotóxico del cortisol y de la dexametasona mediante cursos de viabilidad celular. Se evaluó la participación del receptor de glucocorticoides mediante el ensayo del gen reportero. Se determinó la importancia de la c-IAP1 y de XIAP durante el proceso antiapoptótico mediante la inhibición de su expresión utilizando RNA de interferencia, haciendo clonas transitorias (figura 8).

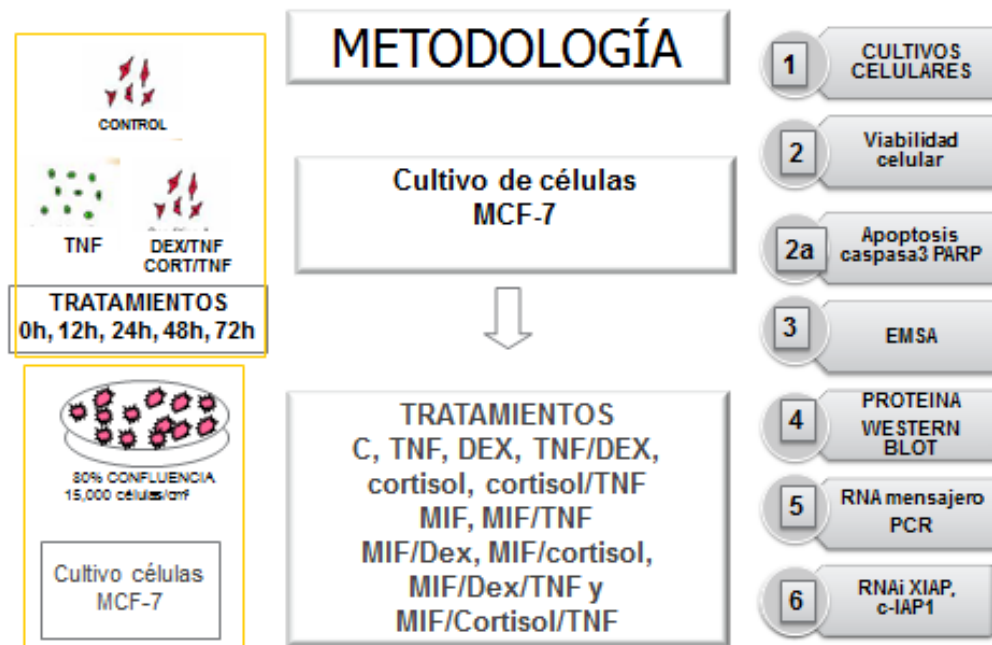


Figura 8. Diagrama de flujo del diseño experimental. El cultivo celular, los tratamientos, la extracción de proteínas, xCELLigence, gen reportero, qRT-PCR, inmunoensayo tipo Western blot, siRNAs.

I. MATERIALES

El cortisol (CORT), la dexametasona (DEX) y el RU486 se obtuvieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), el Factor de necrosis tumoral, recombinante humano (rh TNF) se obtuvo de R & D Systems, Inc. (Minneapolis, MN, USA). Los medios de cultivo celular fueron obtenidos de (GIBCO, Rockville MD, USA) y el Suero fetal bovino (SFB) se obtuvo de Invitrogen Life Technologies (San Diego, CA, USA). Los anticuerpos IgG policlonales de conejo contra c-IAP1 y XIAP fueron obtenidos de Upstate (Merck, Darmstadt, Alemania). Los anticuerpos secundarios monoclonales de conejo contra β -actina fueron de Pierce Biotechnology, Inc. (Rockford, IL, USA), y los anticuerpos IgG anti-ratón y anti-cabra fueron de laboratorios Zymed (Carlsbad, CA, USA). El sustrato quimioluminiscente SuperSignal™ West Pico PLUS fue de ThermoFisher Scientific (Waltham, MA, USA). Las tabletas para el cóctel de inhibidores de proteasas fueron de Boehringer Mannheim (East Sussex, Reino Unido). La cepa de Escherichia coli DH5 α fue de Gibco BRL (Paisley, Reino Unido), que se subclonó en el vector de expresión pcDNA3.1-GR bajo el control del promotor de citomegalovirus p CMV- β Gal.

II. LOS PLÁSMIDOS

Los plásmidos/vectores de expresión pcDNA3.1-GR y GRE-pGL3-LUC fueron donados por el Dr. W. Lee Kraus (Universidad de Cornell) para el Dr. Alfonso León del Río (IIBO, UNAM) quién a su vez nos los proporcionó. Los mapas de los plásmidos empleados se muestran en las figura 9 a y 9 b [35].

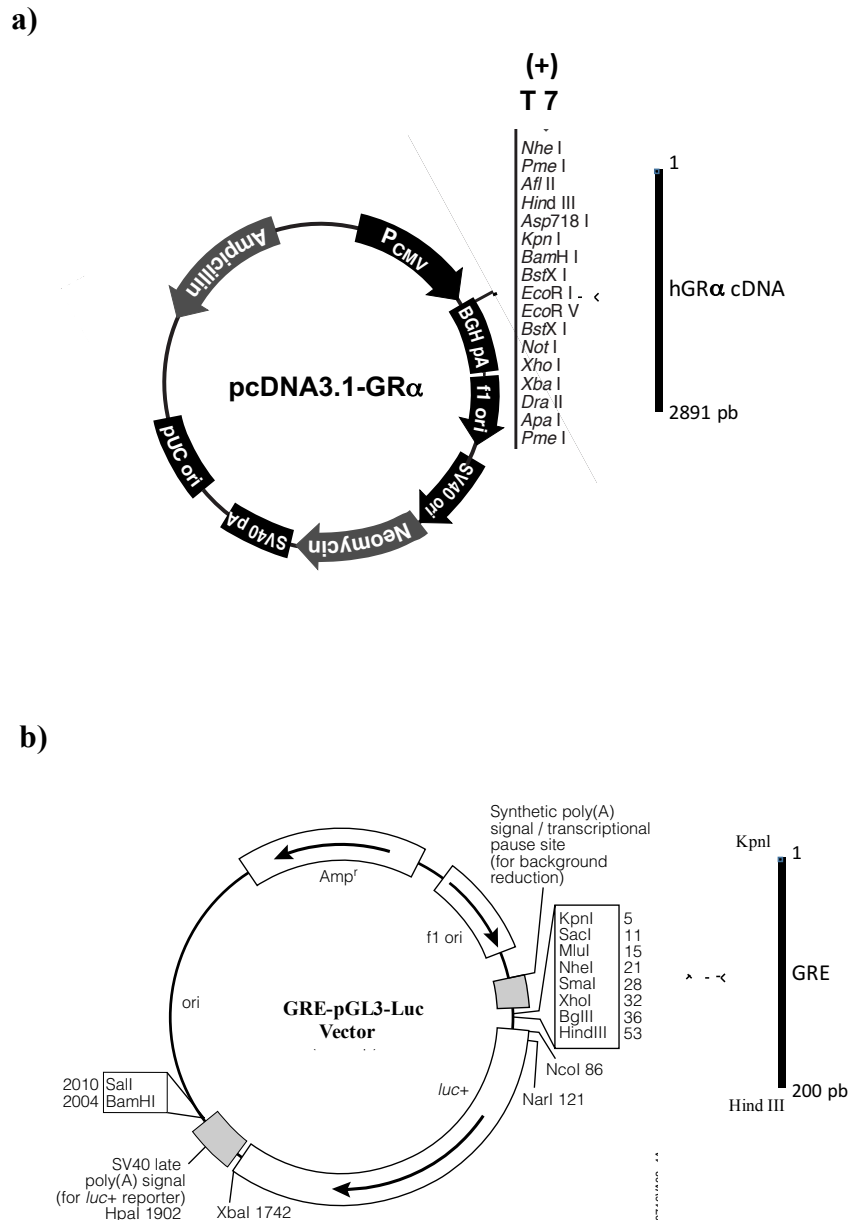


Figura 9. Los vectores pcDNA3.1-GRα y GRE-pGL3-GRE a) Vector pcDNA3.1-GRα de 5.4 kb para la expresión transitoria en hospedero de mamífero, promotor de CMV, gen de resistencia neomicina. Con un cDNA insertado de 2891 pb con EcoR1. Fig. 9 b) mapa circular del vector GRE-pGL3-LUC, cDNA que codifica para luciferasa de luciérnaga, gen de resistencia a ampicilina, ori origen de la replicación, con un elemento de respuesta a glucocorticoides (GRE) insertado de 200 pb con KpnI y HindIII.

III. EL CULTIVO CELULAR

La línea celular MCF7 (ATCC® HTB-22™) aislada de un cáncer humano de mama, luminal A, que contiene GR (figura 12) se obtuvo de la American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA). La línea celular HeLa (ATCC® CCL-2™) de adenocarcinoma de cuello uterino fue utilizada como un modelo de apoptosis ante la radiación con luz UV. Y la línea celular BT474 (ATCC® HTB-20™) aislada de un carcinoma ductal de mama humano, fue utilizada como un modelo celular que expresa HER2/neu positivo.

Las células MCF7 fueron crecidas en medio RPMI-1640 suplementado con 10% (v/v) de suero fetal bovino (FBS) inactivado a 56°C durante 30 min, adicionado con 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina y 0.25 µg/mL de anfotericina B y 2 mM de L-glutamina. En una atmósfera humidificada que contiene 5% de CO₂ y 100% e humedad relativa, a 37 ° C. Todas las soluciones empleadas para el cultivo celular fueron esterilizadas con membranas de filtración de 0.22 µm (Millipore, Merck, Darmstadt, Alemania). Para los ensayos con células MCF7 tratadas con glucocorticoides y con RU486, el medio de cultivo utilizado debió estar libre de estructuras esteroideas, por lo que se utilizó medio de cultivo RPMI-1640 sin rojo de fenol, suplementado con 2% de suero fetal bovino deslipidado (SFBd) (SFB + 10% carbón activado, en agitación durante toda la noche a 4 °C y centrifugado hasta eliminar todo el carbón activado presente y filtrado para esterilizarlo antes de usar).

IV. EL CURSO TEMPORAL DE VIABILIDAD CELULAR POR TINCIÓN CON CRISTAL VIOLETA

La línea celular MCF7 se sembró en una placa de 48 pozos a una densidad de $1.5 \times 10^4/\text{cm}^2$ en 500 µL/pozo con medio de cultivo RPMI-1640 sin rojo de fenol suplementado con 2% SFBd. Los glucocorticoides son solubles en ETOH absoluto, por lo que como control/vehículo se utilizó un blanco que contiene ETOH al 0.1% y se le nombró como ETOH o control. Las células MCF7 se estimularon con los GCs a una concentración final de 10 µM de cortisol, dexametasona o RU486 (Mifepristona) y/o con 10 ng/mL de TNF y ETOH al 0.1%. La viabilidad celular se midió mediante un ensayo de tinción con cristal violeta, las células fueron fijadas a las 24, 48 y 72 h después del tratamiento, con la adición de 200 µL/pozo de glutaraldehído al 1.1% durante 20 min al final de cada experimento. Después de esto, las placas se tiñeron con 300 µl de solución de tinción de cristal violeta (0.1% de

crystal violeta ácido fórmico al 10%) durante 20 min. El exceso de solución de tinción de cristal violeta se eliminó con agua destilada, y las células se secaron al aire. La tinción celular con cristal violeta se disolvió con 500 µL de ácido acético al 10%. Se colocaron 150 µL de esta mezcla en placas de 96 pocillos y se cuantificó a 590 nm en un lector de placas de ELISA. Los resultados se muestran en los histogramas en donde la intensidad de color del cristal violeta es proporcional a la viabilidad celular.

V. EL ENSAYO DE VIABILIDAD EN TIEMPO REAL POR xCELLigence™

El monitoreo dinámico de la viabilidad de las células MCF7 se realizó con el sistema de detección electrónica de células en tiempo real, xCELLigence™ RTCA (ACEA Biosciences, San Diego CA, USA). Este sistema utiliza placas microelectrónicas (E-Plates) integradas con matrices de micro-oro con electrodos en el fondo de los pozos.

La densidad celular así como cambios en su morfología provocan cambios en la impedancia medida. Por tanto, una disminución en el número de células como resultado de la muerte inducida por TNF se refleja como una disminución de la impedancia.

Los valores de impedancia se corrigen restando el índice celular de un pozo al tiempo de interés menos el índice celular al inicio del experimento entre una constante y el índice celular al tiempo que se puso el estímulo, a este valor se le conoce como Índice celular normalizado (NCI).

El índice celular normalizado es igual a:

$NCI = [(Z_i - Z_o) / \Sigma \sigma] / Z_e$ en donde

Z_i = índice celular al tiempo de interés

Z_o = índice celular al inicio del experimento

$\Sigma \sigma$ = es una constante

Z_e = índice celular al tiempo en que se puso el estímulo

Células MCF7 fueron sembradas a una densidad celular óptima para el ensayo de proliferación celular ($1,8 \times 10^4/cm^2$) en una placa E-plate-16, especial para el RTCA. Las células se adhirieron al fondo de cada pozo, cubriendo la superficie del sensor que monitorea las células midiendo el NCI.

Las curvas de crecimiento celular fueron registradas en tiempo real cada 30 min y el NCI se registró dinámicamente sin cambio de medio y sin que las placas fueran manipuladas.

VI. EL ENSAYO DEL GEN REPORTERO

Células MCF7 fueron sembradas a una densidad de 2×10^5 células en placas de cultivo de seis pozos que contenían 2 mL de RPMI-1640 sin de rojo fenol suplementado con 5% de SFBd y se cultivaron durante 24 h antes de que las células se transfectaran. Para la transfección celular se empleó el método de co-precipitación con fosfato de calcio-DNA [$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$], que incluyó 2.0 μg del gen reportero GRE-Tk-LUC, 0.1 μg de pCMV- β Gal (control de transfección) y 0.25-1.0 μg de pcDNA3.1-GR. Después de 6 h de transfección, las células se lavaron dos veces con solución salina amortiguadora con fosfato pH 7 (PBS) y se trataron con cortisol 1 μM , dexametasona 1 μM , TNF 1 ng/mL o con vehículo (etanol al 0.1%) durante 24 h en RPMI-1640 libre de rojo de fenol complementado con SFBd al 5%. Las células se lavaron con PBS y se cosecharon en un amortiguador de lisis que contenía Tritón X-100 al 1% en PBS. La actividad de la luciferasa y de la β -galactosidasa se midió utilizando un luminómetro Monolight 3010 (Becton & Dickinson Pharmingen, San Diego, CA), siguiendo las instrucciones del proveedor del estuche de reactivos para la medición de la luminometría producida por la luciferasa Promega. (Madison, EE.UU.)

VII. EL ENSAYO CON RNA DE INTERFERENCIA

Para interferir contra la expresión de c-IAP1 y XIAP, se utilizaron siRNA de QIAGEN Biotechnology (Cambridge, MA, EE. UU.). Y se utilizó el protocolo del fabricante para cada uno de los siRNA dirigidos contra c-IAP1 o XIAP. Se emplearon los juegos con cuatro siRNAs contra c-IAP1 humano (QIAGEN-GS329 # cat.1027416), y los juegos con cuatro siRNAs contra XIAP humano (QIAGEN # cat. 1027416) y un juego de siRNAs control sin actividad represora que no silenciaron a ninguna de las IAPs (QIAGEN # cat 1027280), así como un siRNA control inductor de muerte celular (QIAGEN # 1027298). Las transfecciones se hicieron con lipofectamina plus (QIAGEN # 301705).

La reducción en la expresión de c-IAP1 y XIAP se determinó por inmunoensayo tipo Western blot empleando los anticuerpos anti-c-IAP1 y anti-XIAP, normalizando contra β -actina, en extractos totales celulares 18 h después de la transfección, siguiendo las recomendaciones de la hoja técnica de QIAGEN. Se probaron los cuatro siRNAs contra RNAm de *c-IAP1* mostrado en la Fig. 17a: c-IAP1-siRNA1, c-IAP1-siRNA2, c-IAP1-siRNA 3 y c-IAP1-siRNA 4, así como los cuatro siRNA contra *XIAP* mostrado en la Fig. 17b: XIAP-siRNA1, XIAP-siRNA2 , XIAP-siRNA3 y XIAP-siRNA4. Los siRNAs elegidos para transfectar a las células MCF7 fueron: c-IAP1-siRNA 3 que disminuyó la

expresión de c-IAP1 en 89% y XIAP-siRNA 2 que disminuyó la expresión de XIAP en 91%. En todos los casos la viabilidad se evaluó como se describe en el ensayo de viabilidad por tinción con cristal violeta.

VIII. EL INMUNOENSAYO TIPO WESTERN BLOT

Las células MCF7 fueron sembradas a una densidad de $1,5 \times 10^4$ células/cm² y se cultivaron por 24 h en placas de cultivo de 100 mm, posteriormente se estimularon con 10 μ M de cortisol, dexametasona, y/o TNF 10 ng/mL, vehículo (ETOH, 0.1%) durante diferentes lapsos (3, 6, 12, 18, 24, 36 y 48 h). Al finalizar cada lapso se realizó extracción de proteínas totales a cada uno de los cultivos estimulados. Para la extracción de proteínas los extractos celulares se lisaron en un amortiguador RIPA (Tris 50 mM, EDTA 5 mM, NaCl 150 mM, Nonidet-40 al 0.5%, PMSF 1 mM, pH= 8,0) seguido de centrifugación (4,000 g durante 5 min). La concentración de proteína en el lisado celular total se midió usando el ensayo de Bradford con Albúmina sérica bovina (ASB) como estándar. Los lisados celulares completos (30 μ g) se diluyeron con un amortiguador de carga Laemmli 5X (Tris-HCl 125 mM, pH 6.8, SDS 1% v/w, glicerol 10% v/v, azul de bromofenol 0.1% w/v, β -mercaptoetanol 2% v/v). Se corrieron por electroforesis en geles de poliacrilamida-Tris-glicina al 10% y se separaron mediante SDS-PAGE en una cámara de electroforesis Mini Protean III (Bio-Rad Hércules, CA, USA). Las proteínas separadas se electro-transferieron a una membrana de Poli vinil-di-floruro (PVDF) (Amersham, Buckinghamshire, UK) durante toda la noche con un amortiguador de transferencia (Tris-HCl 25 mM, metanol 10%, pH 7.5).

El inmunoensayo tipo Western blot se realizó utilizando los siguientes anticuerpos IgG policlonales primarios de conejo específicos: anti-c-IAP1 (dilución 1: 1,500; catálogo Upstate # 07-759; Merck, Darmstadt, Alemania); anti-XIAP (dilución 1: 2,000; catálogo Upstate # 07-753; Merck Darmstadt, Alemania); PARP1 anti-PARP1 maduro (dilución 1: 200; R&D Systems, Minneapolis, MN, EE. UU.); PARP1 anti-escindido (dilución 1: 200; R&D Systems, Minneapolis, MN, EE. UU.); y receptor anti-HER2 / neu (dilución 1: 3,000; Santa Cruz Biotechnology SC-284; Dallas, Texas, EE. UU.). Se usaron los siguientes anticuerpos primarios IgG de ratón adicionales en los experimentos: receptor anti-GR α (dilución 1: 500; Santa Cruz Biotechnology, SC-393232); receptor anti-PR β (dilución 1: 100; Santa Cruz Biotechnology SC-810); receptor anti-ER α (dilución 1: 250; Santa Cruz Biotechnology SC-8005); y anti- β -actina (dilución 1: 10,000; R&D Systems, Minneapolis, MN, EE. UU.). Los anticuerpos

conjugados con HRP secundarios anti-conejo (dilución 1: 10,000), IgG (dilución 1: 10,000) y anti-cabra (dilución 1: 5,000) se adquirieron de Zymed (San Francisco, CA), y el anti-ratón Se obtuvo IgG (dilución 1: 15,000) de Pierce (Rockford, IL, EE. UU.). Las proteínas se visualizaron en una película de rayos X utilizando un ensayo de quimioluminiscencia mejorada utilizando el sustrato quimioluminiscente SuperSignal™ West Pico PLUS de ThermoFisher Scientific (Waltham, MA, EE. UU.).

IX. LA PCR EN TIEMPO REAL (qRT-PCR)

Se trató un microgramo de RNA total con 1 unidad de DNA asa durante 30 minutos a 37 °C. El DNA complementario (DNAc) se sintetizó utilizando un kit de transcripción inversa de DNAc de alta capacidad de Applied-Biosystems (Foster CA, USA) De acuerdo con las especificaciones del fabricante. Brevemente, se preparó una mezcla maestra usando 50 U de enzima retro-transcriptasa (RT) multiscribe, 0.8 µL de mezcla de dNTP (100 µM total), 2,0 µL de amortiguador RT 10X, 3.8 U de inhibidor de RNA asa, 1 µL de cebadores aleatorios (10X), y 1 µg de RNA total de muestra en un volumen final de 15 µL completado con agua libre de nucleasa. La mezcla se incubó a 25 ° C durante 10 minutos, seguido de incubación a 37 ° C durante 1 hora y a 85 °C durante 5 s. El DNAc se utilizó para llevar a cabo la cuantificación de transcripciones mediante PCR en tiempo real (qRT-PCR). se utilizaron oligonucleótidos específicos como se muestra en la Tabla 3, en un sistema Step-One de Applied-Biosystems (Foster CA, USA). La reacción de amplificación contenía 200 ng de cDNA, 7.5 µL Master-Mix (SYBR Green) de Applied-Biosystems (Foster CA, USA), 10 pmol de cada cebador en un volumen final de 15 µl, completado con agua libre de nucleasas. Las condiciones del ciclo de PCR fueron 95 °C/ 2 min, seguidas de 40 ciclos de 95 °C/15 s y de 60 °C/1 min. Después de 40 ciclos, se realizó el método Delta-CT para comparar los niveles de las transcripciones. Los resultados se expresaron como 2 elevado a la potencia negativa de la diferencia entre CT-TNF y CT-IAP menos la CT-ETOH (2- Δ ct). La especificidad de la PCR se determinó con el programa de curva de fusión. Los resultados se expresaron como el número de copias del gen diana normalizado con la proteína de unión a la caja TATA (TBP).

Nº	OLIGONUCLEOTIDO	SECUENCIA	T _m (° C)	TAMAÑO PRODUCTO PCR	POSICIÓN
1	<i>NAIP F</i>	5'-TTC TTG CCC TGA AAA CTG CT-3'	59.99	169	3312-3480
2	<i>NAIP R</i>	5'-CGT ATT GGG AAG TGG ATG CT-3'	59.96		
3	<i>c-IAP1 F</i>	5'-TGA ACG AAA AAG AGG TAG CAC-3'	59.99	294	3454-3507
4	<i>c-IAP1 R</i>	5'-CCG GTA TTA GTA CAA TGC CAA A-3'	59.99		
5	<i>c-IAP2 F</i>	5'-CCA AGT GGT TTC CAA GGT GT-3'	59.86	119	3733-3851
6	<i>c-IAP2 R</i>	5'-TGG GCT GTC TGA TGT GGA TA-3'	60.07		
7	<i>XIAP F</i>	5'-GTG CGG TGC TTT AGT TGT CA-3'	59.91	294	340- 633exón2
8	<i>XIAP R</i>	5'-AGG GTT CCT CGG GTA TAT GG-3'	60.03		
9	<i>Survivina F</i>	5'-GGA CCA CCG CAT CTC TAC AT-3'	59.96	183	166-348
10	<i>Survivina R</i>	5'-TCC TCT ATG GGG TCG TCA TC-3'	59.89		
11	<i>Apollon F</i>	5'-TGT CAC CTC TTC AGC CAC AG-3'	60.02	112	6571-6682
12	<i>Apollon R</i>	5'-GCC ACA TAA TCC AGC AAC CT-3'	59.96		
13	<i>ML-IAP F</i>	5'-TGG CCT CCT TCT ATG ACT GG-3'	60.21	101	445-545
14	<i>ML-IAP R</i>	5'-GCA CCT CAC CTT GTC CTG AT-3'	60.12		
15	<i>TS-IAP F</i>	5'-TCA CTT GAG GGA GCT CTG GT-3'	59.99	274	1504-1777
16	<i>TS-IAP R</i>	5'-CAG GGC TGA TTT CTC TCT GC-3'	60.46		
17	<i>GR a F</i>	5'-TAC CCT GCA TGT ACG ACC AA-3'	59.99	212	2399-2610
18	<i>GR a R</i>	5'-TCC TTC CCT CTT GAC AAT GG-3'	60.04		
19	<i>TBP F</i>	5'-CCA CAG CTC TTC CAC TCA CA-3'	59.99	254	493-2826
20	<i>TBP R</i>	5'-CTC ATG ATT ACC GCA GCA AA-3'	59.99		
21	<i>GUS B F</i>	5'-AAA CGA TTG CAG GGT TTC AC-3'	59.99	171	399-610
22	<i>GUS B R</i>	5'-CTC TCG TCG GTG ACT GTT CA-3'	59.99		

Tabla 3. Las secuencias de oligonucleótidos utilizados para la qRT-PCR. Lista de 22 oligonucleótidos, las secuencias de cebadores, la posición, la T_m y el tamaño del producto de la PCR utilizados para la q RT-PCR en el proyecto.

X. EL ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO

Los datos se obtuvieron de un recurso público en línea [17,36]. A partir de él, se accedió a la base de datos pública y curada (The Breast Invasive Carcinoma) (TCGA, Provisional). Se seleccionaron los z-scores de RNAm (RNA Seq V2 RSEM) para *NR3C1* y para los ocho miembros de la familia de genes *IAP*. Debido a que no se disponía de una clasificación automática de las muestras tumorales en los luminales A, B, HER2 y TNBC, se descargaron los datos para ER α , HER2 y PR β por IHQ. Las muestras tumorales se segregaron en la categoría de subtipo intrínseco correcto en función de su estado positivo o negativo de ER α , PR β y HER2 por IHQ. El gráfico del diagrama de dispersión del RNAm de *NR3C1* frente al subtipo intrínseco se creó usando el software Microsoft Excel (fig 19, tabla 9). Los gráficos y la tabla de *NR3C1* frente a los miembros de la familia de genes *IAP* se obtuvieron directamente de la pestaña de trazado del cBioportal, los resultados se mencionan en la discusión.

XI. EL ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Cada experimento se realizó al menos tres veces. Los datos se presentan como media \pm desviación estándar (SD). Los datos se analizaron usando el Análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido del método de Bonferroni para comparaciones múltiples. Un nivel de * $p < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo.

Para dos experimentos de siRNA, se examinó el efecto del tratamiento sobre la viabilidad celular para cada siRNA con ANOVA; para el caso de c-IAP1 y XIAP, empleamos un GLM (modelo lineal general) con distribución de error gamma. Además, examinamos la interacción del tipo y tratamiento de siRNA a través del análisis de desviación. El análisis post hoc de Tukey se realizó en los respectivos casos para qRT-PCR.

LOS RESULTADOS

1 El cortisol y la dexametasona interfieren con la muerte inducida por el TNF en las células MCF7

El TNF es una citocina pleiotrópica que provoca la inducción de muerte celular mediada por las caspasas. En 2001 Messmer [15] reportó que la dexametasona interfiere con la muerte celular inducida por el TNF en células humanas de cáncer de mama MCF7.

Nosotros investigamos si otros glucocorticoides en particular el cortisol, principal glucocorticoide fisiológico, tiene una actividad semejante a la dexametasona. El tratamiento con glucocorticoides en las células MCF7 ejerció un efecto citostático que a las 48 h se reflejó en la disminución de las figuras mitóticas 35 y 29% para el cortisol y la dexametasona, respectivamente.

Consistente con esta observación la densidad celular disminuyó en 76 y 67% para el cortisol y la dexametasona, respectivamente, datos mostrados en la figura 10.

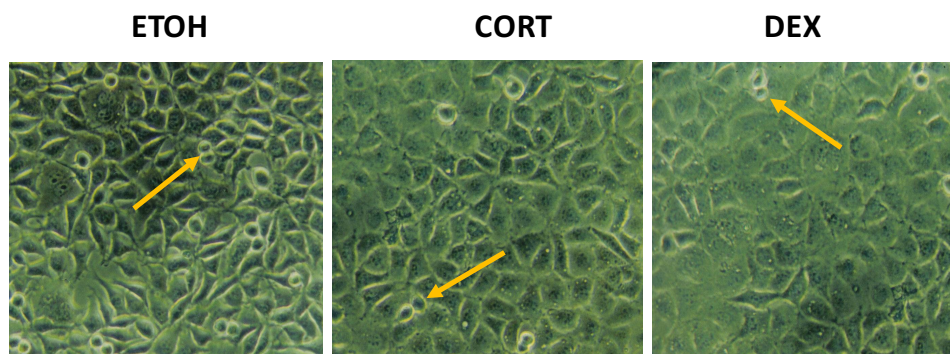


Figura 10. La adición de glucocorticoides ejerce cambios en la proliferación en células MCF7. Estas micrografías muestran células MCF7 tratadas con vehículo (ETOH 0.1%), cortisol 10 μ M y dexametasona 10 μ M durante 48 h

El tratamiento con TNF durante 48 h indujo una reducción significativa en el número de células y en su morfología, las células tratadas con TNF presentaron una morfología espiculada en comparación con las células control que sólo recibieron vehículo (ETOH 0.1%) como tratamiento (figura 11a).

Este cambio en la morfología se presentó después de las 72 h de tratamiento, pero no se presentó ante el tratamiento combinado de TNF + cortisol o TNF + dexametasona.

A partir de las 48 h de tratamiento sólo con TNF comienzan a presentarse fragmentos celulares en los pozos, indicativo de muerte celular, a las 72 h ya hay células despegadas y un aumento en los

fragmentos celulares y para las 96 h más del 90% de las células se encuentran despegadas hay un gran acúmulo de fragmentos celulares (datos no mostrados).

La viabilidad celular se registró a las 24, 48 y 72 h (figura 11b). En las células tratadas con TNF, el cortisol aumentó la viabilidad en un 24-33% (* $p < 0,05$; figura 11b, panel superior), mientras que la dexametasona aumentó la viabilidad celular en un 30-35% (* $p < 0,05$; Figura 11b, panel inferior), con respecto al TNF sin glucocorticoides.

Con el fin de evaluar la cinética de la protección de los dos glucocorticoides en las células MCF7 tratadas con TNF, se midió el Índice celular normalizado (NCI) y la tasa de cambio en tiempo real durante 72 h cada 30 min en el sistema xCELLigenceTM (figura 11c). Las células MCF7 se les dio el mismo tratamiento como en la figura 11a.

En términos generales en las células control tratadas con etanol se observó un aumento continuo de la impedancia en tres etapas que correlaciona con una proliferación continua (descripción detallada en la tabla 4).

El tratamiento con TNF (figura 11c, línea verde) siempre marcó pendientes negativas hacia abajo y disminuyó en tres etapas (bajó, meseta y bajó nuevamente implicando muerte celular) con una meseta entre la primera y la segunda etapa y un punto de inflexión entre la segunda y la tercera etapa (descripción detallada en la tabla 4).

En las células con tratamiento combinado de CORT + TNF (figura 11c, línea negra) la pendiente aumentó en dos etapas con un punto de inflexión intermedio y después se presentó una meseta, una pequeña pendiente negativa seguida de otra meseta y finalmente la pendiente disminuyó (descripción detallada en la tabla 4).

En las células con tratamiento combinado de DEX + TNF (figura 11c, línea naranja) las pendientes se comportaron muy semejante a las células tratadas con la combinación CORT + TNF. La única diferencia es que la segunda etapa tiene una mayor duración y por tanto alcanza un valor en el NCI mayor al de las células con el tratamiento CORT + TNF.

Los resultados mostraron que las células estimuladas con diferentes tratamientos (Fig. 11c, líneas de colores) aumentaron o disminuyeron el NCI registrado en diferentes etapas, algunas con meseta o puntos de inflexión entre una etapa y otra, y mostraron pendientes positivas o negativas.

Tratamiento	Color	Etapas	Lapso (h)	Pendiente (m)	Comentarios
ETOH	rojo	1 ^a	3-21	+ 0.0186	meseta 21-30 y 44-52 h m=duplicó 2.02 veces m=aumentó 15%
		2 ^a	30-44	+ 0.0375	
		3 ^a	52-72	+ 0.0432	
TNF	verde	1 ^a	14-27	- 0.0233	meseta 27-40 h m=disminuyó 10%
		2 ^a	40-50	- 0.0208	
			punto de inflexión 50		
		3 ^a	50-72	- 0.0062	m=disminuyó 33 veces
CORT	violeta	1 ^a	3-12	+ 0.0566	m= muy alta m=disminuyó 66 veces
		2 ^a	12-42	+ 0.0187	
			meseta 42-72		
		3 ^a	62-72	- 0.0161	m=se volvió negativa
DEX	azul	1 ^a	3-12	+ 0.0566	m=es la más alta de todas
		2 ^a	12-42	+ 0.0187	m=aumentó 20%
			meseta 42-72		
		3 ^a	62-72	- 0.0161	m=se volvió negativa
CORT+TNF	negro	1 ^a	3-12	+ 0.0566	m= muy alta m=disminuyó 66 veces
		2 ^a	12-42	+ 0.0187	
			meseta 42-72		
		3 ^a	62-72	- 0.0161	m=se volvió negativa
DEX+TNF	naranja	1 ^a	3-12	+ 0.0566	m=es la más alta de todas
		2 ^a	12-42	+ 0.0187	m=aumentó 20%
			meseta 42-72		
		3 ^a	62-72	- 0.0161	m=se volvió negativa

Tabla 4. Las tasas de cambio en tiempo real. Durante 72 h se monitorearon las células en tiempo real. A cada lapso se le calculó la pendiente. Pendiente positiva es sobrevivencia y/o proliferación y negativa es muerte. Datos obtenidos en el sistema xCELLigenceTM en células MCF7 control (ETOH), o tratadas con TNF, CORT, DEX, CORT + TNF y DEX + TNF.

Para hacer una comparación de las tasas de proliferación de los seis grupos experimentales elegimos una ventana de tiempo que corresponde al lapso entre 30-44 h y que señalamos con la letra “a” en la figura 11c. En esta ventana “a” se mostraron las siguientes pendientes en la tabla 5:

Grupo	Pendiente (NCI/h)	Normalización (%)
Control (ETOH línea roja)	0.025	100
TNF (línea verde)	-0.01	NA
Cortisol (línea violeta)	0.009	36
Dexametasona (línea azul)	0.014	56
CORT + TNF (línea negra)	0.016	64
DEX + TNF (línea naranja)	0.022	88

Tabla 5. La ventana de tiempo “a” en el xCELLigence. Correspondiente al lapso entre 30-44 h y que señalamos con la letra “a” en la figura 11c.

Si la tasa de crecimiento es negativa significa que la impedancia que ejercen las células pegadas a la caja de cultivo es menor lo que significa que las células se han despegado implicando muerte celular. Mientras que para TNF la tasa de crecimiento es negativa de -0.01 NCI/h, indicativa de muerte celular, con los glucocorticoides la tasa se volvió positiva (64 y 88% para CORT + TNF y DEX + TNF respectivamente), reflejando un marcado efecto protector.

En el histograma (figura 11d), se muestran los valores promedio de NCI de la figura 11c a las 24, 48 y 72 h para los diferentes tratamientos y se muestra en la tabla 6:

Las células con tratamiento combinado de CORT + TNF, mostraron valores promedio de NCI de 2.2, 4.8 y 8.3 veces mayor que las células tratadas solo con TNF a las 24, 48 y 72 h, respectivamente, mientras que las células con tratamiento combinado de DEX + TNF, mostraron valores promedio de NCI de 2.3, 5.1 y 8 veces mayor que las células tratadas solo con TNF a las 24, 48 y 72 h, respectivamente.

Grupo	NCI			% Viabilidad		
	24h	48h	72h	24h	48h	72h
Control (ETOH línea roja)	1.13	1.76	2.66	100	100	100
TNF (línea verde)	0.70	0.40	0.20	61	22	7
Cortisol (línea violeta)	1.13	1.30	1.33	100	74	50
Dexametasona (línea azul)	1.27	1.56	1.60	112	89	60
CORT + TNF (línea negra)	1.56	1.90	1.66	138	10	62
DEX + TNF (línea naranja)	1.63	2.06	1.60	144	117	60

Tabla 6. Los valores promedio del índice celular normalizado (NCI). NCI y el porcentaje de la viabilidad a diferentes lapsos 24, 48 y 72 h como resultado de los diferentes tratamientos en las células MCF7.

En conjunto todos estos datos confirman que el cortisol tiene un efecto protector semejante al de la dexametasona.

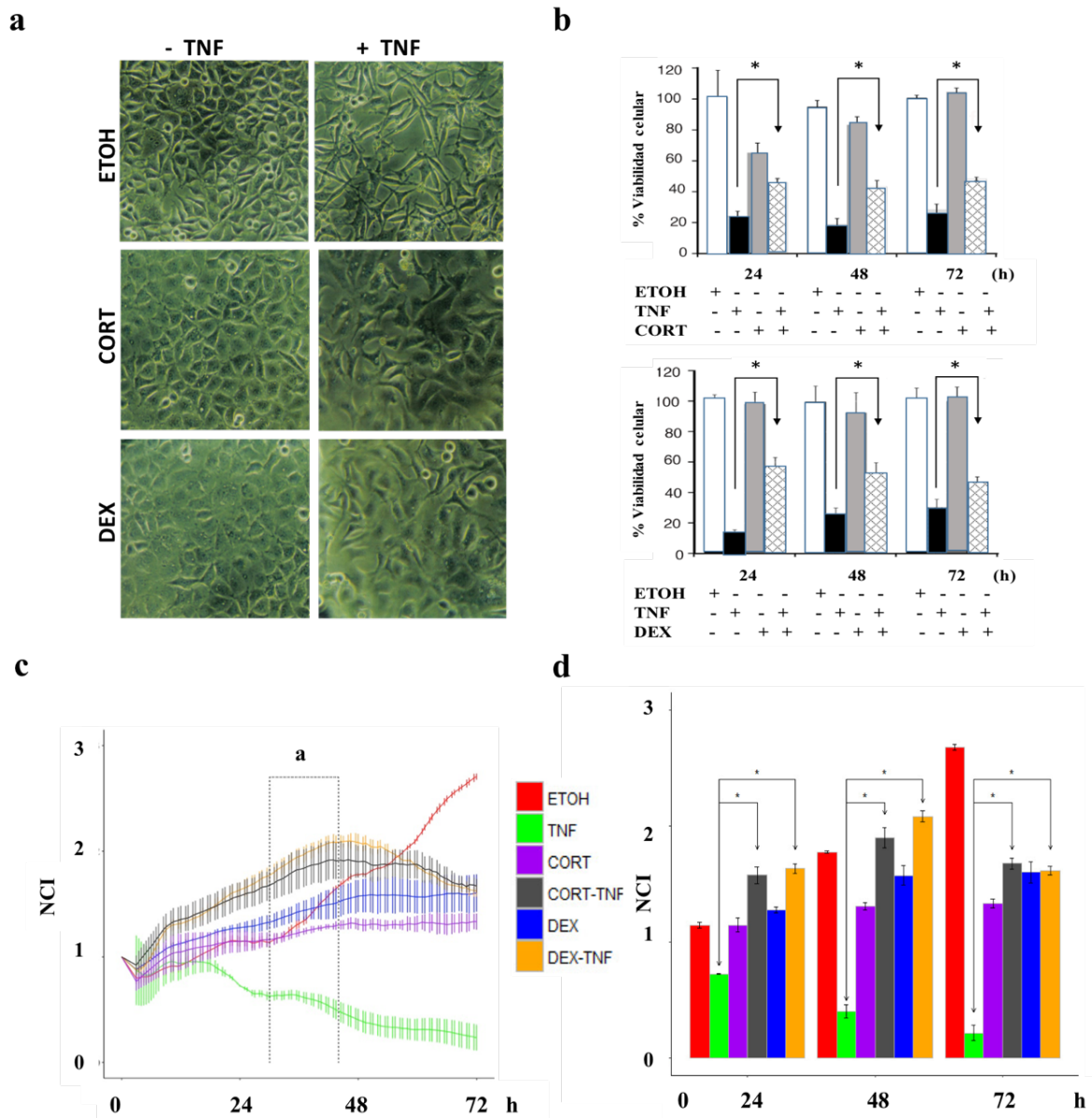


Figura 11. La dexametasona y el cortisol interfieren con el efecto citotóxico del TNF en células MCF7.

a) Micrografía de cultivo confluyente de células tumorales MCF7 tratadas durante 48 horas con vehículo/etanol al 0.1% (ETOH), cortisol 10 μ M (CORT), dexametasona 10 μ M (DEX), sin (-) o con (+), Factor de necrosis tumoral (TNF) 10 ng/mL. Las imágenes representativas de células MCF7 se tomaron con un aumento de X100.

b) Cursos de viabilidad de células MCF7 tratadas durante 24, 48 y 72 h. b) Panel superior: ETOH, TNF, CORT y CORT + TNF. b) Panel inferior: con dexametasona en lugar de cortisol (* $p < 0.05$).

c) Índice celular normalizado (NCI), son curvas de células MCF7 tratadas durante 72 h con ETOH = rojo, TNF = verde, CORT = violeta, CORT + TNF = negro, DEX = azul, y DEX + TNF = naranja. Las comparaciones de NCI para líneas verticales de 24, 48 y 72 h representan la desviación estándar (SD) de cada punto de medición. La región “a” se eligió para definir los efectos de los tratamientos que se definen en el texto.

d) Histograma de NCI durante 24, 48 y 72 h de tratamiento. Las barras verticales representan la SD de cada medición, los asteriscos representan diferencias significativas entre los tratamientos (* $p < 0.001$). Los datos se presentan como la media \pm SD, n = 3.

El efecto protector de ambos glucocorticoides resultó ser muy similar a lo largo de las 72 h analizadas. Observamos que después de 24 h de tratamiento combinado con CORT + TNF y DEX + TNF el NCI registrado fue 2.25 veces mayor que en las células tratadas solo con TNF, a las 48 h estas diferencias aumentaron cerca de 5 veces contra las de TNF y a las 72 h alcanzaron una diferencia de 8 veces. Estos resultados corroboran que existe un efecto protector de los dos glucocorticoides evaluados y que además este efecto es muy similar entre ellos.

2 El receptor de glucocorticoides participa en la protección conferida por el cortisol y la dexametasona

Mediante el inmunoensayo tipo Western blot, se determinó la expresión basal de los receptores de las células MCF7. Se observó que sin tratamiento expresan el receptor de glucocorticoides, el receptor de estrógeno (ER α) y expresión es mínima del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2) y no expresan el receptor de progesterona (PR β) (Figura 12) [38, 39].

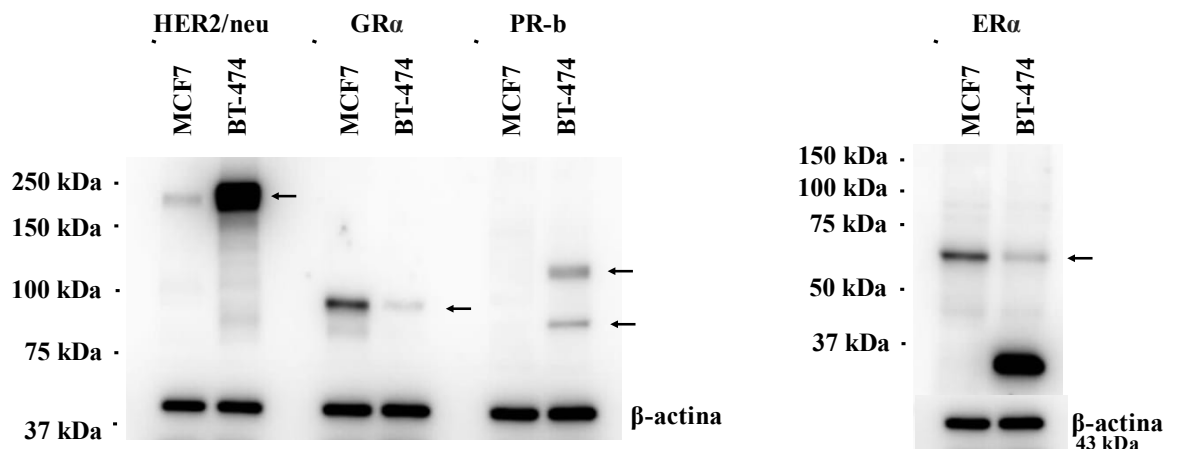


Figura 12. Inmunoensayo tipo Western blot para la detección de los receptores nucleares en células de cáncer de mama MCF7 y BT474. Extractos de proteínas totales (30 μ g) de células MCF7 (luminal A) o BT474 (HER2 +). Las flechas muestran el peso molecular esperado para cada uno de los receptores analizados (HER2/neu, receptor del factor de crecimiento epidérmico humano tipo 2; GR, receptor de glucocorticoides; PR, receptor de progesterona; ER, receptor de estrógeno).

Para analizar si el efecto protector conferido por el cortisol y la dexametasona está mediado por la unión a su receptor de glucocorticoides, se evaluó la viabilidad celular en presencia de RU486/Mifepristona un antagonista parcial del receptor de glucocorticoides, a las 24, 48 y 72 h de tratamiento. La similitud en la estructura química del RU486 con el cortisol y la dexametasona (figura 3) hace que el RU486 compita por el sitio de unión de los glucocorticoides a su receptor.

Observamos que en presencia del antagonista RU486, ni el cortisol ni la dexametasona inhibieron el efecto citotóxico del TNF (Fig. 13a y 13 b, respectivamente). A las 48 h, el 50% de las células MCF7 tratadas con CORT + TNF eran viables, en comparación con el 20% de las células tratadas con TNF solo, estos datos se describen en la tabla 7. Con el triple tratamiento: CORT + TNF + RU486, la viabilidad celular disminuyó a 16% (Fig. 13a). De manera similar, el 50% de las células tratadas con DEX + TNF eran viables, en comparación con el 19% de las células tratadas con TNF solo. Con el tratamiento con DEX + TNF + RU486, la viabilidad disminuyó a 21% (Fig. 13b). Estos resultados respaldan que el efecto protector del cortisol y la dexametasona requiere de la unión al receptor de glucocorticoides a concentraciones de 10 μ M cada uno y que puede ser competida con RU486 a la misma concentración de 10 μ M.

Grupo	Viabilidad %	Disminución de la viabilidad (%) en presencia de RU486
Control (ETOH)	100	NA
TNF	20	0
Cortisol	68	
Dexametasona	105	
RU486	60	NA
CORT + TNF	50	
CORT + TNF + RU486	16	34
DEX + TNF	55	
DEX + TNF + RU486	21	34

Tabla 7. Efecto del agonista parcial RU486 en células MCF7 tratadas con cortisol y dexametasona.

También se determinó si la actividad transcripcional del receptor de glucocorticoides inducida por cortisol o por dexametasona se vería afectada por el tratamiento con TNF. Con este fin, probamos la actividad de la luciferasa como un gen reportero bajo el control de un promotor artificial con cuatro

elementos de respuesta al receptor de glucocorticoides insertado dentro del plásmido pcDNA3.1-GR que se transfectó en forma transitoria en células MCF7.

El tratamiento con cortisol 1 μ M promovió la activación del receptor de glucocorticoides 4 veces, mientras que con CORT + TNF alcanzó solo 2.8 veces con respecto al control/vehículo (ETOH al 0.1%) pero esta diferencia no fue estadísticamente significativa al tratamiento sólo con cortisol (Fig. 13c). Por otro lado, dexametasona 1 μ M promovió una activación de hasta 6 veces y cuando se combinaron DEX + TNF ejerció un efecto similar de 5,7 veces (figura 13d), nuevamente, esta diferencia no fue estadísticamente significativa. Por el contrario, en todos los casos en los que se usó el antagonista RU486 (1 μ M), la actividad de luciferasa varió de 1,6 veces para RU486 a 2,3 veces para TNF + RU486 que tampoco alcanzó significancia estadística.

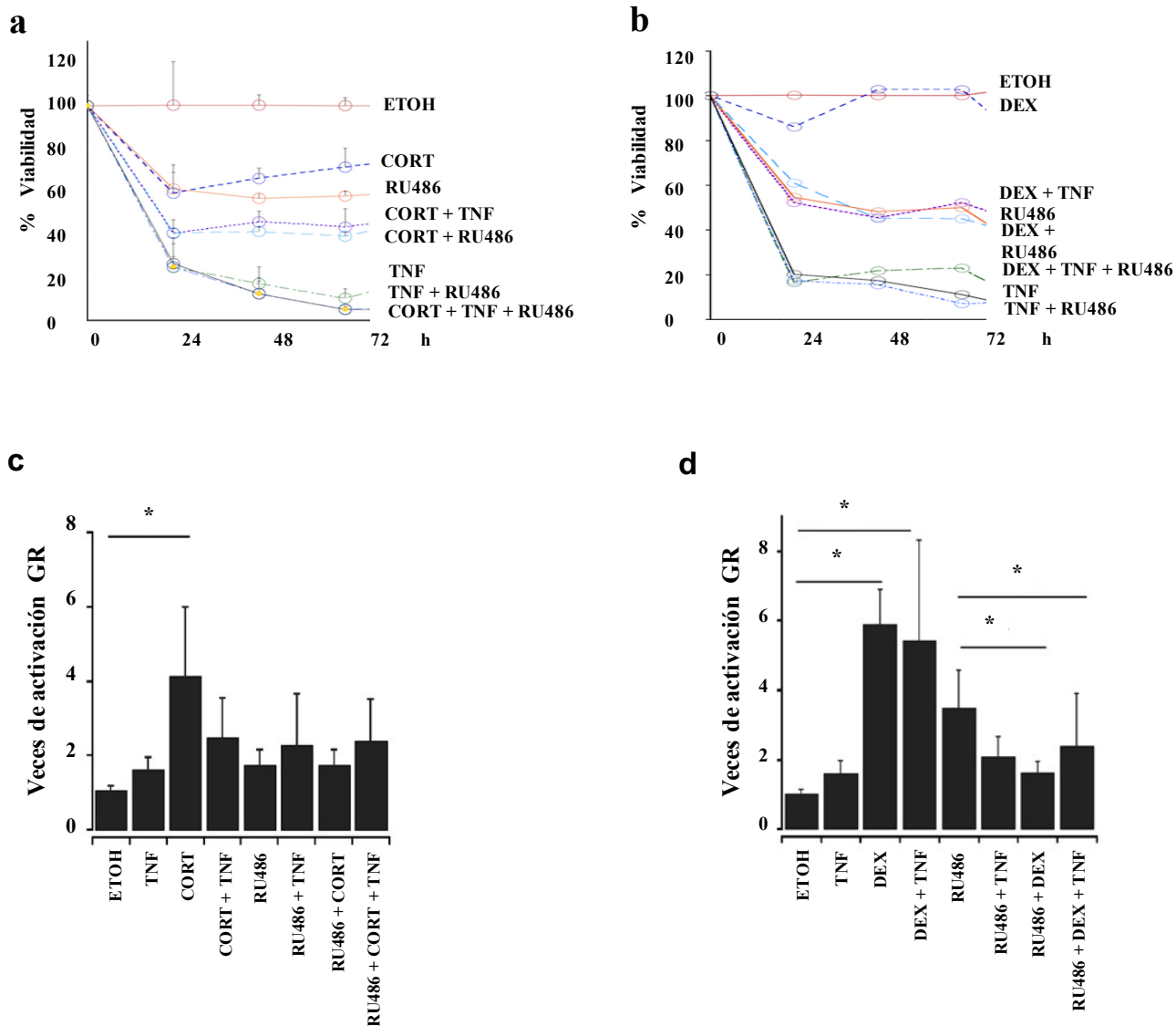


Figura 13. La protección anticitotóxica conferida por el cortisol y la dexametasona está mediada por el receptor de glucocorticoides.

a) Cursos de viabilidad de células MCF7 tratadas durante 24, 48 y 72 h, con a) ETOH 0.1%, TNF, CORT y CORT + TNF, o combinados con RU486 10 μ M (RU486), RU486 + TNF, RU486 + CORT, y RU486 + CORT + TNF; (* $p < 0.005$). b) Igual que en a) pero con dexametasona en vez de cortisol. Todos los valores fueron más bajos que el ETOH; (* $p < 0.005$). c) y d) actividad de la luciferasa (Luc) como medida indirecta de la transcripción dependiente del receptor de glucocorticoides. c) con cortisol 1 μ M y RU486 1 μ M y TNF 1 ng / mL y analizados por Luc/ β -Galactosidasa. Tratado por 24 h; (* $p < 0.05$). d) con dexametasona 1 μ M en lugar de cortisol; (* $p < 0.005$). Los datos se presentan como media \pm desviación estándar (SD); n = 3.

Tomados en conjunto, estos resultados indicaron que bajo condiciones experimentales donde los glucocorticoides protegen contra el TNF 1 ng/mL, la actividad transcripcional dependiente del receptor de glucocorticoides no se ve afectada por la presencia de TNF. En consecuencia, nuestros resultados apoyan nuestra interpretación que el receptor de glucocorticoides participa en la protección anticitotóxica por el cortisol y la dexametasona en células tumorales MCF7 tratadas con TNF.

3 La presencia del cortisol y la dexametasona inhibe el procesamiento de PARP1 en células MCF7 tratadas con TNF y sugiere la expresión de un inhibidor de las proteínas de la apoptosis

Para establecer si el efecto citotóxico del TNF implicaba muerte celular, buscamos el procesamiento de la enzima PARP1 (poli ADP-ribosil-polimerasa 1) un marcador de daño celular. Usamos un control celular positivo para apoptosis, las células HeLa radiadas por 5 min con luz ultravioleta (UV), las células MCF7 no funcionan para este modelo. El inmunoensayo tipo Western blot (Fig. 14a) mostró que, en cultivos tratados con TNF, se encontró PARP1 procesado solo a las 48 h (Fig. 14a, carril 7). Sin embargo, cuando el TNF se combinó con cortisol o dexametasona, no hubo procesamiento detectable de PARP1, lo que sugiere la falta de actividad de esta enzima. Tomados en conjunto estos resultados sugieren que los glucocorticoides interfirieron con el procesamiento de PARP1. La ausencia de PARP1 procesado en las células tratadas con la combinación de GCs + TNF sugiere la interferencia con el procesamiento de PARP1, posiblemente un inhibidor de las proteínas de las caspasas (Fig. 14a, carriles 8 y 9). El aumento en la expresión relativa de PARP1 procesado es evidente en células MCF7 tratadas con TNF durante 48 h (Fig. 14b, carriles 1 y 7). Sin embargo, los tratamientos combinados GCs + TNF disminuyeron el procesamiento de PARP1.

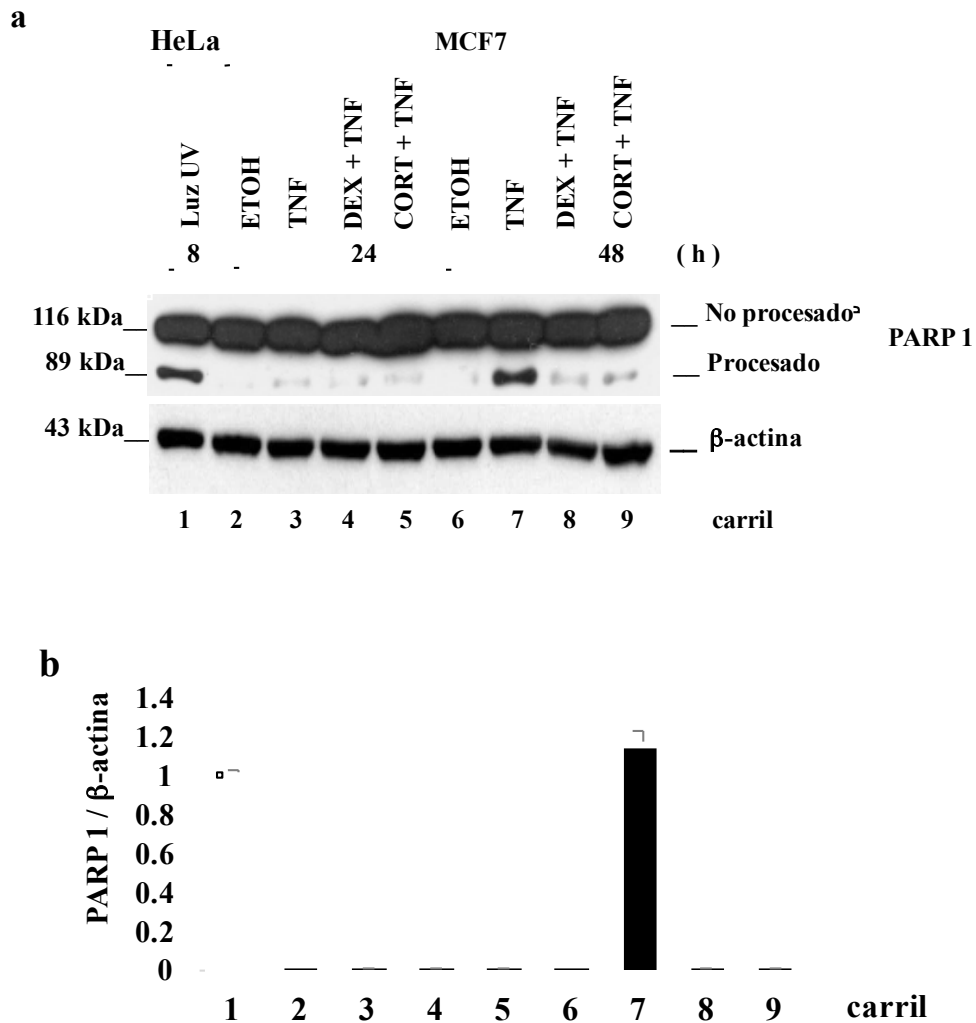


Figura 14. La muerte en células MCF7 tratadas con TNF se correlaciona con el procesamiento de la Poli ADP-ribosa polimerasa 1 (PARP1).

a) Inmunoensayo tipo Western blot de 30 μ g de proteínas totales de células MCF7, tratadas con ETOH 0.1% (vehículo), TNF, CORT + TNF y DEX + TNF durante 24 y 48 h (carriles 2-9). En el carril 1, células HeLa tratadas con luz ultravioleta (UV) como control positivo del procesamiento de PARP1. PARP1 maduro (116 kDa) y PARP1 procesado (89 kDa). b) Histograma de los niveles de PARP1 normalizados con β -actina. Todas las relaciones PARP1/ β -actina se normalizaron contra el control positivo (HeLa + UV) carril 1. En los carriles 2 al 5 muestran PARP1/ β -actina después de 24 h de tratamiento, los carriles 6 al 9 muestran PARP1/ β -actina después de 48 h de tratamiento.

4 El efecto protector del cortisol y la dexametasona mantiene los niveles intracelulares de la c-IAP1 y la XIAP en células MCF7 tratadas con TNF

La falta de procesamiento de PARP1 bajo el tratamiento combinado con GCs + TNF se podría explicar por la presencia de un inhibidor de las proteínas de la apoptosis de la familia IAP, por esta razón se realizaron cursos temporales para seguir los cambios en el contenido de c-IAP1 y XIAP por medio de inmunoensayo tipo Western blot.

Después de evaluar los niveles de proteína durante diferentes lapsos que van desde 3 hasta 48 h, observamos que en las células tratadas con TNF los niveles de c-IAP1 disminuyeron (Fig. 15a, fila superior y 15b, barras grises), así como los niveles de XIAP (figura 15c, fila superior y 15d, barras grises).

En contraste, el tratamiento combinado de CORT + TNF condujo a una expresión sostenida de c-IAP1 (figura 15a, fila central y 15b, barras negras) igual que para XIAP (figura 15c, fila central y 15d, barras negras). Se obtuvieron resultados similares cuando las células se sometieron al tratamiento combinado DEX + TNF (figuras 15e y 15f para c-IAP1, y las figuras 15g y 15h para XIAP).

En todos los casos, el tratamiento combinado de GCs + TNF produjo una diferencia significativa en el contenido de c-IAP1 y de XIAP. Para ambos, el contenido de proteínas IAPs después de 48 h de tratamiento combinado no reveló una diferencia estadísticamente significativa con el contenido de proteínas a las 3 h.

En todos los casos, el contenido de IAPs a las 48 h fue mayor en las células con el tratamiento combinado en comparación con las células tratadas sólo con TNF (* $p < 0,01$). Estos resultados sugieren que los glucocorticoides previenen la degradación de IAPs o promueven su síntesis. En cualquier caso, los niveles sostenidos de c-IAP1 y de XIAP podrían estar relacionados con la protección contra la citotoxicidad mediada por TNF.

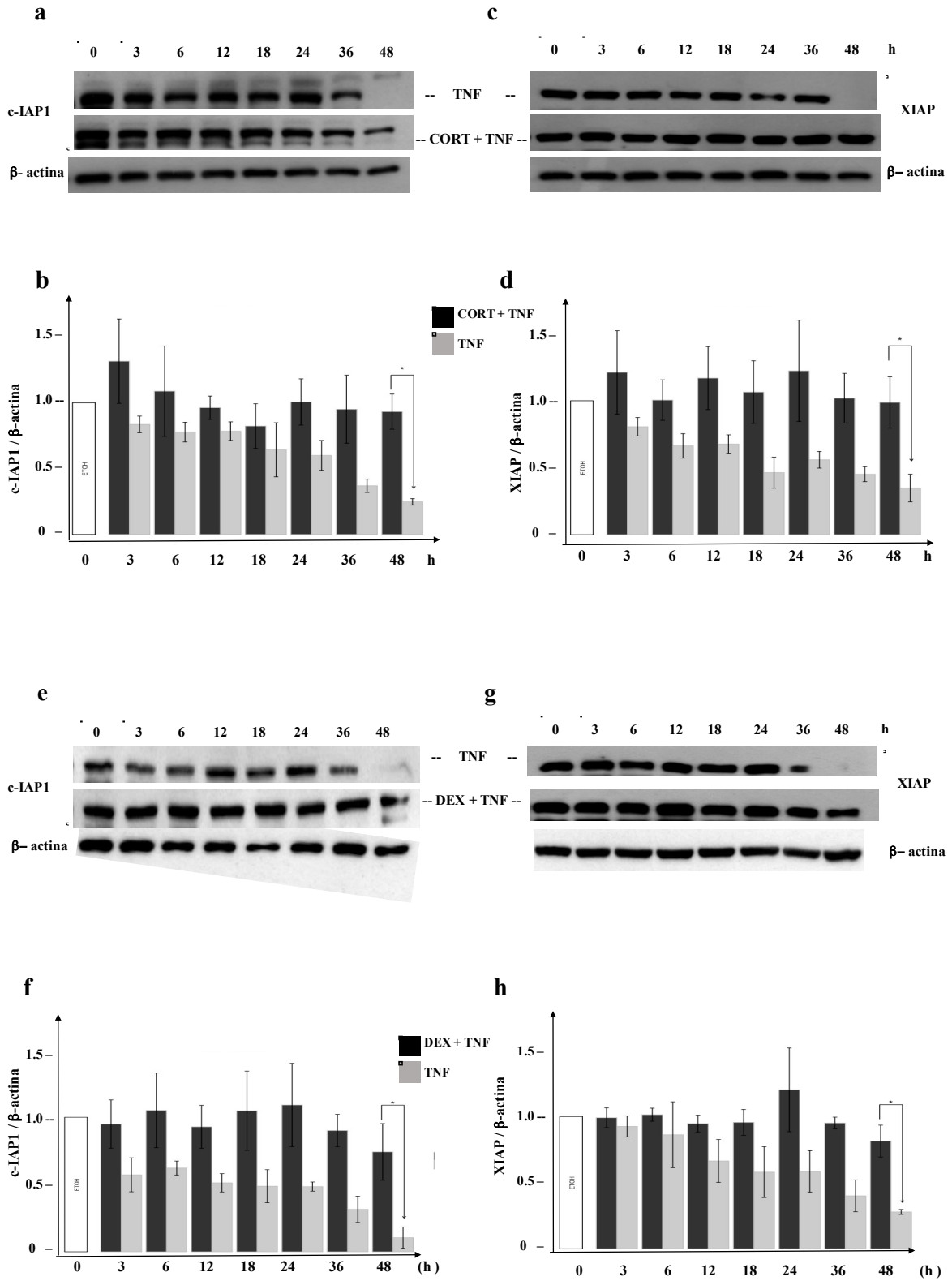


Figura 15. La expresión de los niveles sostenidos de c-IAP1 y de XIAP se asocia al tratamiento con cortisol y con dexametasona durante la protección contra el TNF.

Inmunoensayo tipo Western blot contra XIAP a) y e) y contra c-IAP1 c) y g) de cursos temporales de células MCF7 estimuladas con las combinaciones CORT + TNF a) y c) o con, DEX + TNF e) y g) y extraídas después de 3, 6, 12, 18, 24, 36 y 48 h. Se usaron 30 µg de proteínas totales por carril. Histogramas de la expresión relativa de c-IAP1 y XIAP normalizadas contra sus valores correspondientes de β-actina (densidad relativa) de células MCF7 tratadas con cortisol b) y d) y dexametasona f) y h). Las líneas verticales indican la desviación estándar (DE) de la media (* P <0.005). Los datos se presentan como media ± DE; n = 3.

5 El cortisol y la dexametasona inducen un aumento en los niveles de RNAm de la familia IAP en células MCF7 tratadas con TNF

Para confirmar si la protección de la muerte mediada por glucocorticoides activada por la citotoxicidad por TNF se asoció con el aumento de la expresión de IAP, analizamos el contenido de RNAm de todos los miembros de la familia de IAP de mamíferos y del GR por qRT-PCR. La figura 16a y b muestra un mapa de calor con el aumento del contenido de RNAm a las 18 h después de los tratamientos simples o combinados con (ETOH, TNF, CORT, DEX o CORT + TNF, DEX + TNF) analizados mediante qRT-PCR. Todos los datos fueron normalizados contra el grupo control (vehículo/ETOH 0.1%). El contenido de RNAm por qRT-PCR para el receptor de glucocorticoides (figura 16 a), presentó un aumento significativo de 24 ± 4 veces para el tratamiento combinado CORT + TNF. Se observó que todos los RNAm de las ocho IAPs (figura 16 b), aumentaron en presencia de cortisol y dexametasona, el aumento más significativo se presentó con el tratamiento combinado de CORT + TNF en el siguiente orden de aumento expresado como veces de cambio: survivina ($539 \pm 0,1$); c-IAP1 [(176 ± 25)]; NAIP (102 ± 17); Apollon (26 ± 3); XIAP ($4 \pm 0,6$); Ts-IAP ($4 \pm 0,2$); ML-IAP ($3 \pm 0,4$) y c-IAP2 ($1 \pm 0,1$). Los resultados de las IAPs coinciden con el efecto obtenido para el receptor de glucocorticoides, se mantienen altos niveles de RNAm de IAPs durante la protección, en particular en términos de su efecto sobre c-IAP1 y XIAP.

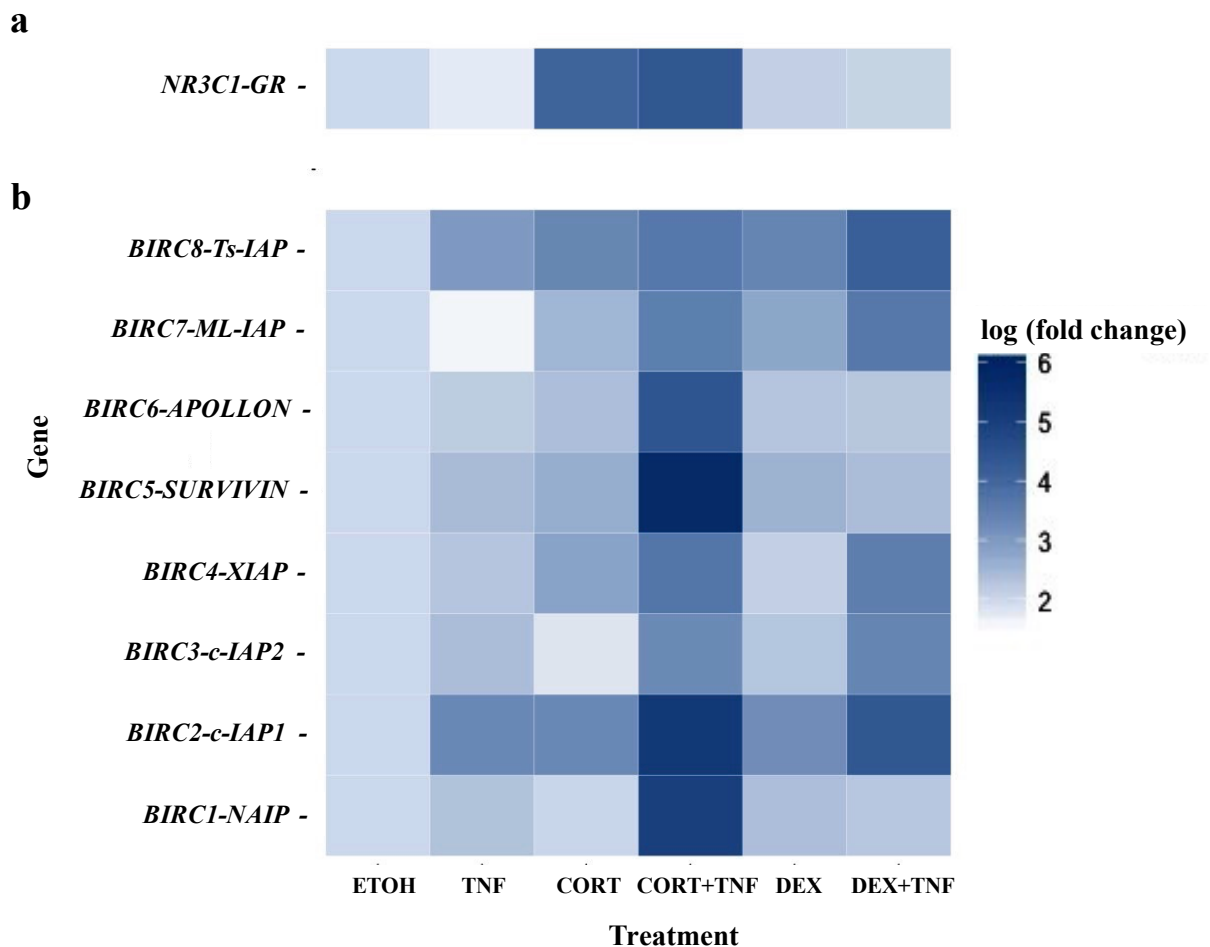


Figura 16. Mapa de calor de los niveles de expresión de RNA mensajero del gen del receptor de glucocorticoides N3RC1 y de la familia de genes IAP en respuesta a los distintos tratamientos.

Panel a): receptor de glucocorticoides. Panel b): los ocho miembros de la familia IAP de mamíferos. Los datos se normalizaron frente a las células tratadas con etanol (ETOH). Los datos corresponden al aumento con respecto al control (ETOH + desviación estándar [SD]); n = tres experimentos independientes). Escala \log_2 (veces de cambio).

6. siRNA contra c-IAP1 y XIAP interfiere con la protección conferida por cortisol o dexametasona

Para proporcionar un soporte adicional de la importancia de la ruta GR-IAP en la protección conferida por cortisol o dexametasona en células MCF7 tratadas con TNF interferimos con su expresión utilizando siRNA contra c-IAP-1 y XIAP, como se describe en materiales y métodos.

Se eligieron los dos siRNAs que redujeron la señal de c-IAP1 y XIAP en un 89 y 91% (figura 17a y 17b respectivamente), (c-IAP-siRNA3 y XIAP-siRNA2). A las 24 horas después de la transfección, las células fueron tratadas con ETOH, TNF, CORT, CORT + TNF o DEX, DEX + TNF para evaluar la importancia de la expresión de IAP en la protección conferida por glucocorticoides evaluando la viabilidad con cristal violeta 18 horas después del tratamiento. Sin embargo, la interferencia contra las dos IAPs fue parcial aunque los cambios fueron estadísticamente significativos (* $p < 0.05$) (Fig. 17c y Tabla 8).

La protección conferida por CORT + TNF disminuyó 18.6% para c-IAP1 y 21.6% para XIAP, mientras que la protección conferida por DEX + TNF disminuyó 22.5% para c-IAP1 y 28.2% para XIAP (Tabla 8).

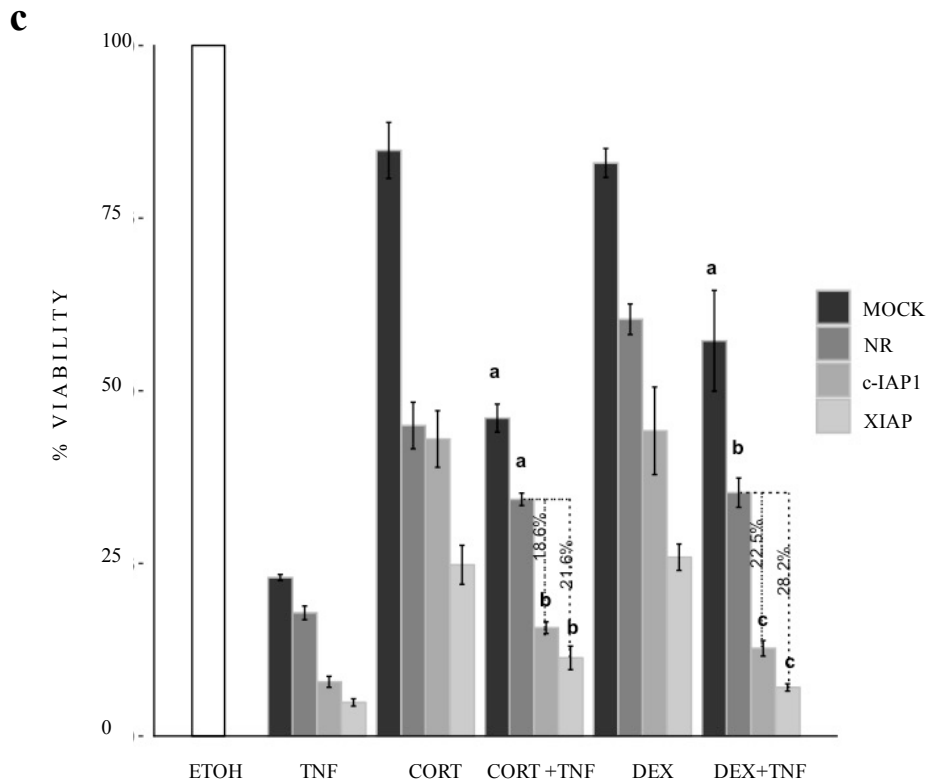
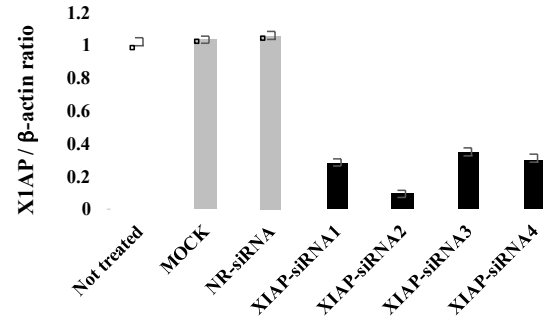
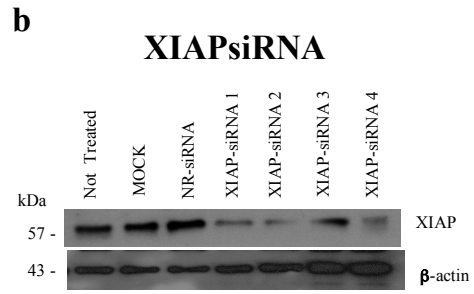
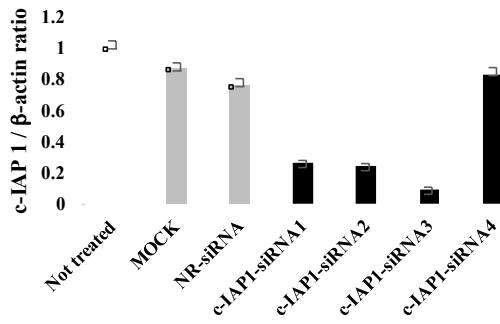
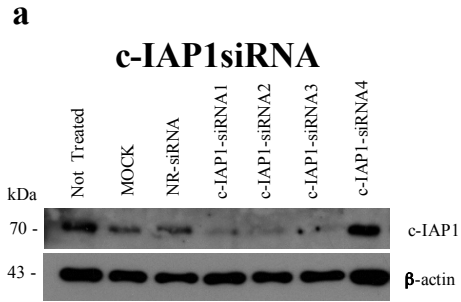


Figura 17. La protección contra TNF conferida por glucocorticoides disminuye al interferir con c-IAP1 o XIAP.

Inmunoensayo tipo Western blot de células MCF7 transfectadas con cuatro siRNA contra c-IAP1 (a) o XIAP (b) durante 18 h con su respectivo histograma y relación IAP/ β -actina. MOCK: sin ningún siRNA, no transfectado; NR-siRNA: transfectado con un siRNA-no relacionado; c-IAP1-siRNA y XIAP-siRNA, del 1 al 4 (con cuatro secuencias diferentes cada uno). Los histogramas que representan siRNA contra c-IAP1 y XIAP se normalizaron con su relación de β -actina. Las líneas verticales indican la desviación estándar de la media (* P <0.005). Los datos se presentan como media \pm desviación estándar [SD]; n = 3. c) Ensayo de viabilidad de células MCF7 24 h con los tratamientos indicados. Promedio de dos experimentos independientes realizados en secuencia sextuplicada cada uno, las líneas verticales representan la desviación estándar de la media; * p <0.05. Las letras indican distintas agrupaciones basadas en la comparación estadística post hoc (p <0.05). Las barras que comparten la misma letra indica que no difieren estadísticamente. Los datos se presentan como media \pm DE; n = 2.

Tratamiento	TNF %	CORT %	CORT + TNF %	DEX %	DEX + TNF %
Vector vacío	23	85	46	83	57
NR-siRNA	21	53	41	72	42
c-IAP1-siRNA 3	13	69	*18.6	71	*22.5%
XIAP-siRNA 2	14	70	*21.6	73	*28.2%

Tabla 8. Análisis de la disminución de la protección citotóxica mediante siRNA con c-IAP1 o XIAP presentada en la figura 17c).

Los valores representan el % de viabilidad a las 18 h de tratamiento. MOCK: Transfección sin siRNA; NR-siRNA: Transfección con siRNA no-relacionado. c-IAP1-siRNA 3 and XIAP-siRNA 2. Transfección con la expresión mas baja de IAP-siRNA, * representa la disminución de la viabilidad %, resultado de la interferencia contra c-IAP1 y XIAP.

DISCUSIÓN

En nuestros resultados, encontramos que en las células de cáncer de mama MCF7, la citotoxicidad mediada por el TNF es causa de daño irreversible que aumenta con el tiempo generando desde cambios en la morfología y en la proliferación celular hasta desencadenar la muerte a partir de las 48 h de tratamiento. Si interferimos con los glucocorticoides, cortisol o dexametasona este daño disminuye significativamente. De estos resultados surge una pregunta, ¿que provoca que los glucocorticoides abatan la citotoxicidad mediada por el TNF? Los glucocorticoides inducen un aumento en la proliferación celular, inhiben la muerte celular, o ambas cosas. Ya se había reportado que los glucocorticoides pueden detener la proliferación de las células MCF7 [52]. De acuerdo a nuestros resultados los tratamientos con cortisol y con dexametasona redujeron la proliferación celular. En cambio cuando se combinaron el cortisol y la dexametasona con el TNF, las tasas de proliferación celular aumentaron en 34 y 28% con respecto al tratamiento solo con cortisol y dexametasona y 51 y 66% para la combinación CORT + TNF y DEX + TNF respectivamente comparándolo con el tratamiento solo con TNF (Fig. 11c). Esta mejora en la tasa de proliferación en las células con el tratamiento combinado sugiere que la disminución de la proliferación celular inducida por glucocorticoides no está directamente implicada en el efecto protector. En la figura 11c, la ventana de tiempo analizada señalada con la letra “a” lapso 30-44 h, se observó que los glucocorticoides tienen un efecto anti proliferativo ya que las pendientes disminuyen entre 64% y 44% para cortisol y dexametasona respectivamente. Analizando la figura 11c ambos glucocorticoides mostraron efectos protectores con pendientes positivas (64 y 88%) para cortisol y dexametasona respectivamente. Con la combinación de glucocorticoides + TNF la pendiente pasó de negativa con TNF a positiva con CORT + TNF y DEX + TNF. Esto nos llevó a proponer la posible participación de mecanismos adicionales relacionados con la actividad transcripcional de los glucocorticoides que podrían estar relacionados con la supervivencia celular, como mediadores antiapoptóticos; de hecho, se ha informado que los glucocorticoides inducen la expresión de IAPs [52]. Este doble efecto también ha sido informado en otros estudios, y el efecto sobre los tumores ha sido controversial; se han descrito a los glucocorticoides tanto como promotores como inhibidores de la proliferación de tumores [53]. Algunos estudios clínicos han informado que los glucocorticoides pueden suprimir la progresión tumoral y la metástasis, especialmente en los tumores con respuesta endocrina [54]. En contraste, otros estudios clínicos informaron que los glucocorticoides en tumores ER negativos se asocian con la resistencia a la

quimioterapia y a un mal pronóstico [55]. Este efecto controvertido podría ser el resultado de varios factores, incluidos los diferentes niveles de expresión del receptor de glucocorticoides (fig. 12), que podrían usarse como biomarcadores del pronóstico en el cáncer de mama luminal ER-positivo de menor grado. Además, el efecto de los glucocorticoides podría verse influenciado por el tamaño del tumor, el estadio y el grado [56], a la dosis respuesta de glucocorticoides en la terapia endocrina y a la señalización inflamatoria; así como a la interacción con una citocina citotóxica, el TNF como se muestra en nuestros resultados. Estas diferencias son de relevancia clínica ya que los glucocorticoides sintéticos, particularmente la dexametasona, se incluyen rutinariamente en el tratamiento por quimioterapia para el cáncer de mama y otras neoplasias malignas no hematológicas para reducir los efectos secundarios, como náuseas, anorexia e hipersensibilidad [6].

Con el fin de documentar la importancia del receptor de glucocorticoides en la protección mediada por cortisol o dexametasona contra el TNF se interfirió farmacológicamente contra dicho receptor. Por su efecto inhibitorio sobre el receptor se utilizó RU486/Mifepristona, un antagonista del receptor de glucocorticoides (figuras 13a y 13b). El hecho de que la protección mediada por el cortisol y la dexametasona contra el tratamiento con el TNF disminuyó en presencia de RU486, sugiere que la presencia del receptor de glucocorticoides sí se requiere para conferir esta protección. Sin embargo es importante resaltar que el uso de RU486 como antagonista está limitado por el hecho de que, cuando se usa solo, puede actuar como un agonista parcial (figuras 13c y 13d) [49]. Actualmente el RU486 no se utiliza en la clínica para el tratamiento del cáncer de mama [43]. Sería recomendable en un futuro realizar experimentos similares empleando siRNAs contra el receptor de glucocorticoides.

La apoptosis es un mecanismo de muerte celular programado que requiere de la activación de una familia de cisteína proteasas [51]. Existen varios marcadores moleculares para detectar la muerte celular dependiente de caspasas. El procesamiento de PARP1 es un marcador molecular asociado a la muerte celular por apoptosis [51]. PARP1 es un sustrato directo de las caspasas efectoras 3, 6 y 7; por lo tanto, el procesamiento de PARP1 es un buen indicador de la actividad proteolítica de las caspasas. La translocación de la proteína fosfatidil serina de la membrana citoplásmica a la membrana extracelular también es un marcador de apoptosis frecuentemente utilizado, pero no está directamente relacionada con la activación de las caspasas. La activación de las caspasas conduce a la fragmentación del DNA e inhibe las vías de reparación del DNA, como la vía que requiere PARP1 [57]. Con el fin de determinar la muerte celular en nuestro proyecto decidimos estudiar a PARP1.

En las células MCF7, se ha documentado que el tratamiento con TNF promueve el procesamiento de PARP1 [16]. En células MCF7 el TNF induce la activación de tales proteasas, lo que conduce al procesamiento de PARP1 de 116 kDa (Poly [ADP-ribosa] polimerasa 1) a una forma de 89 kDa. Las células MCF7 son las únicas células de cáncer de mama que se ha informado tienen una respuesta citotóxica al TNF [14-16].

Se observó el procesamiento del sustrato PARP1 cuando las células se trataron únicamente con TNF (Fig. 14a, carril 7). La adición de CORT o de DEX al tratamiento con el TNF previene la escisión de PARP 1 (Fig. 14a, carriles 8 y 9) podrían implicar que las proteasas activadas para procesar a PARP1 se inhibieron por la presencia de alguno o varios miembros de la familia de las proteínas inhibidoras de la apoptosis. Postulamos que esta interferencia podría explicarse si los glucocorticoides indujeran la expresión de las IAPs [48].

Esta protección sugiere la participación de proteínas inhibidores de la apoptosis (IAPs) que está asociada a la inhibición del procesamiento de PARP1, por lo que fue preciso determinar presencia de IAPs mediante inmunoensayos tipo Western blot.

El tratamiento con TNF induce una disminución en los niveles de proteínas IAP (figuras 15a, 15c, 15e y 15g en la fila superior). Las células tratadas con los GCs + TNF mantienen los niveles de las proteínas IAPs (figuras 15a, 15c, 15e y 15g en la fila central). Este efecto podría resultar de interferir con la degradación de IAPs, de aumentar su transcripción o una combinación de ambos. Las IAPs actúan como inhibidores competitivos de la apoptosis, lo que resulta en un retraso o en la prevención completa de la muerte celular. Las IAPs interactúan con caspasas a través de su dominio BIR y controlan el ensamblaje del "Ripoptosoma". En particular, c-IAP1 y XIAP tienen tres dominios BIR que permiten interactuar selectivamente para controlar la muerte celular [54]. La homeostasis se regula a través de un equilibrio entre la síntesis y la degradación de las proteínas, mediado por la poli-ubiquitinación y la degradación de proteínas en el proteasoma [52]. Con el ánimo de clarificar si los glucocorticoides aumentan la expresión de la c-IAP1 y la XIAP se analizaron los niveles de sus transcritos.

En nuestro primer análisis de expresión de c-IAP1 y XIAP por inmunoensayo tipo Western blot encontramos que el tratamiento con glucocorticoides mantenía niveles altos de proteína de estas dos IAPs. Esto motivó a extender el estudio hacia los demás miembros de la familia IAP que se analizó por medio de qRT-PCR (figura 16a y 16b). Fue interesante notar que el tratamiento con cualquiera de los dos glucocorticoides indujo un aumento en los niveles de transcrito de los ocho miembros, siendo los transcritos que más aumentaron los de c-IAP1 y Ts-IAP. Este efecto de los glucocorticoides se ha

descrito previamente pero no ha sido estudiado a profundidad. El fortalecimiento global de la fisiología celular en respuesta a los glucocorticoides podría tener una contribución por la expresión de esta familia de inhibidores de la apoptosis.

El papel de los glucocorticoides en el cáncer se está estableciendo actualmente por inmunohistoquímica, la localización nuclear del receptor de glucocorticoides se ha demostrado en biopsias tumorales de diferentes tejidos de origen [46]. Con respecto al cáncer de mama, el RNAm del gen del receptor de glucocorticoides (*NR3C1*) está abundantemente presente en biopsias de tumores de pacientes de todos los subtipos intrínsecos (figura 18a y 18b). Además, solo el 3% de las 721 muestras de pacientes en nuestro análisis están mutadas en *NR3C1*. Este hallazgo sugiere que la expresión del receptor de glucocorticoides contribuye con una función biológica relevante para todos los subtipos de cáncer de mama. Un análisis más detallado de la señalización de glucocorticoides podría revelar nuevos genes impulsores y dianas terapéuticas para todos los subtipos de cáncer de mama. Actualmente, la literatura solo señala su valor en el cáncer de mama triple negativo (TNBC) [47]. Aunque la frecuencia de cada subtipo en la base de datos consultada sobreestima al luminal A (61%) y subestima al HER2+ (5%), en general coincide con la prevalencia poblacional informada [48]. Aunque no examinamos los niveles de expresión de la proteína del receptor de glucocorticoides, se ha informado que los tumores ER/PR positivos y de bajo grado expresan altos niveles de GR [49]. Es importante reconocer que la expresión génica en muestras tumorales, tales como las descritas en la figura 18, no implica que la expresión del receptor de glucocorticoides esté restringida a células tumorales; podría expresarse en tipos de células asociadas a tumores no transformadas (células endoteliales, fibroblastos o células inmunitarias). En cuanto a esto tenemos un ejemplo en el que se ha informado de la expresión del receptor de glucocorticoides en células no transformadas asociadas con células luminales A en cáncer de mama humano, como son los fibroblastos asociados a cáncer (CAF) positivos para actina del músculo liso (SMA), que presentan un fenotipo de miofibroblastos (PMY). La expresión del receptor de glucocorticoides en los CAFs en cáncer de mama podría ser un objetivo interesante de estudiar para la terapia futura para poder regular el microambiente tumoral en el cáncer de mama. [50].

Cabe señalar que utilizamos datos de expresión RNA-seq en lugar de información proteómica; limitada a 77 pacientes en esta base de datos. En el caso de *NR3C1*, su producto de proteína posee la función biológica. Es posible que los datos del transcriptoma y del proteoma no se correlacionen y que nuestras conclusiones no sean válidas.

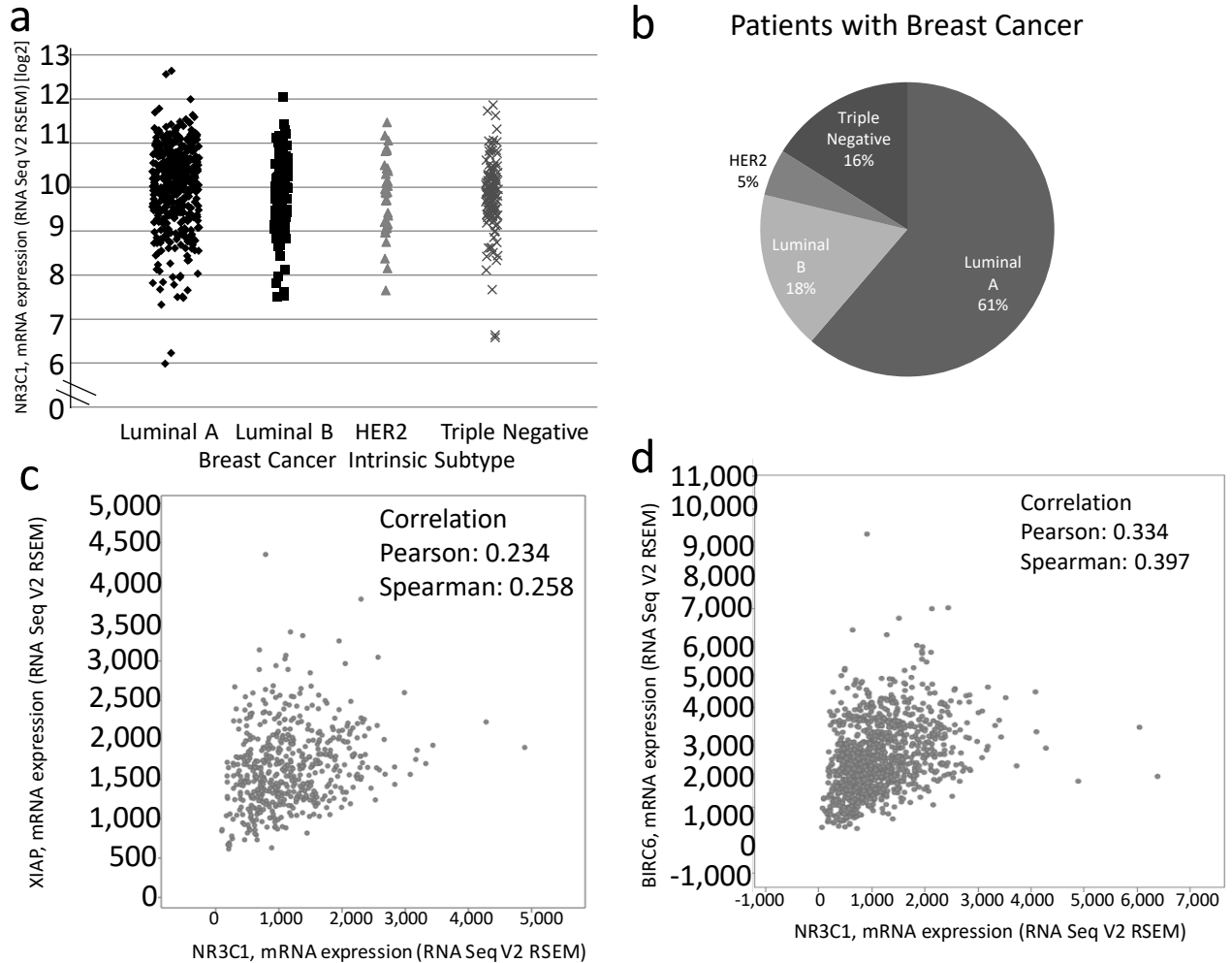


Figura 18. Expresión del gen del receptor de glucocorticoides (NR3C1) y su coexpresión con otros genes en muestras de pacientes con cáncer de mama empleando la base de datos del Bioportal. a) expresión de RNAm de NR3C1 en 721 muestras de diferentes subtipos intrínsecos de cáncer de mama. **b)** Porcentaje de pacientes para cada subtipo intrínseco de cáncer de mama del panel a. **c)** y **d)** Coexpresión del RNAm de NR3C1 con XIAP y BIRC 6, respectivamente, en los datos de 1,100 muestras tumorales de pacientes con cáncer de mama.

Los promotores de la c-IAP1 (figura 19a) y de XIAP (figura 19b) contienen elementos de respuesta a glucocorticoides canónicos (GRE) (figura 19a y 19b, cuadrados blancos), que podrían inducir su expresión en presencia de cortisol y dexametasona.

Además, estos promotores también contienen elementos de respuesta a NF- κ B (KBRE), (figura 19a y 19b, cuadrados negros). Es de destacar que se informó previamente que el tratamiento con el TNF activa a NF- κ B, y que la protección de la dexametasona contra el efecto del TNF depende de la activación de NF- κ B en las células MCF7 [16]. Además, esta protección también está documentada en células de fibroblastos de ratón L929 [62].

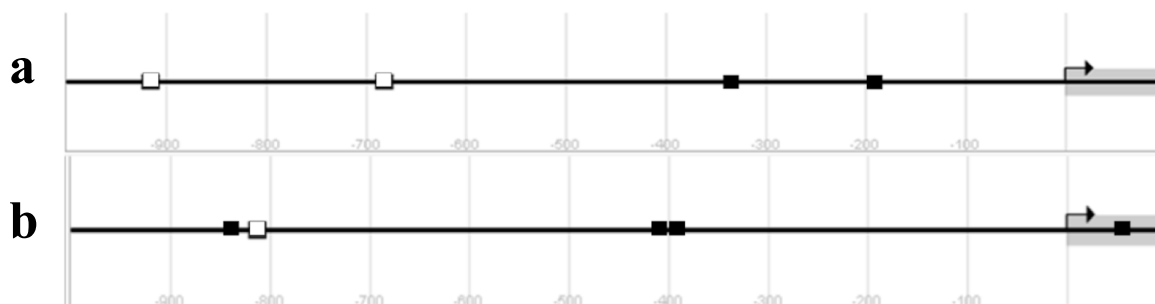


Figura 19. Diagrama parcial de la estructura de los promotores de los genes de c-IAP1 y XIAP. En la secuencias de los genes de a) c-IAP1 y b) XIAP se muestra: Los elementos de respuesta del receptor de glucocorticoides (N3RC1) (GRE) se muestran como cuadrados blancos. (Secuencia GRE AGAACANNNTGTTCT). Los elementos de respuesta NF- κ B (secuencia KBRE AGTTGAGGGGACTTTCCAGG) para la subunidad p65 se muestran como cuadrados negros. Los diagramas se modificaron a partir de los disponibles en la base de datos del promotor eucariótico [69,70].

Nuestros resultados *in vitro* indican que el tratamiento combinado de CORT + TNF induce la expresión RNAm de todos los miembros de la familia IAP (Survivina> c-IAP1> NAIP> Apollon> XIAP> ML-IAP> Ts-IAP> c-IAP2), y el análisis de la base de datos TCGA analizada revela un orden diferente de correlación entre el receptor de glucocorticoides y miembros de la familia IAP, excepto Survivina, que exhibe una correlación negativa (Apollon, XIAP, NAIP, c-IAP1> ML-IAP, Ts-IAP) (Figs. 18c y 18d) (Tabla 9).

Es interesante observar que si aumenta la expresión del receptor de glucocorticoides, también aumenta la expresión de los miembros de la familia IAP tanto *in vitro* como *in vivo* en los datos de RNA-seq, esto podría estar relacionado con el efecto citoprotector de la familia IAP. Si bien es evidente *in vitro* que la expresión de las IAPs depende de la estimulación simultánea de CORT + TNF, *in vivo* solo podemos referirnos a una correlación positiva de la expresión del receptor de glucocorticoides y de la familia IAP. Las discrepancias que existen en el orden de asociación de la expresión del receptor de glucocorticoides y de los miembros de la familia IAP *in vitro* e *in vivo* podrían deberse a las

complejidades de las señales encontradas *in vivo* como son las hormonas, los cambios metabólicos y el microambiente tumoral. Sin embargo, la coexpresión de los genes *GR* e *IAP* puede no indicar la inducción directa y exclusiva de los genes *IAP* por parte de los genes *GR*. Otros factores de transcripción podrían ser necesarios para la inducción de los genes *IAP*. Aún no se ha determinado si el GR se une a los promotores de los miembros de la familia de IAP. Incluso si existe una interacción directa, aún no se ha descrito el nivel en que se produce esta modulación de la expresión génica es decir, si el GR modula la transcripción, la traducción, la semivida del RNAm o la degradación de proteínas de la familia IAP.

Los datos para producir la tabla 9 provienen de muestras tumorales de pacientes con cáncer de mama y se obtuvieron de la base de datos de carcinoma invasivo de mama (TCGA, Provisional) del cBioportal.

Coexpresión con el gen <i>NR3C1</i>	Correlación Pearson (<i>R</i>)
<i>Apollon</i>	0.344
<i>XIAP</i>	0.234
<i>BIRC3 (c-IAP2)</i>	0.210
<i>NAIP</i>	0.210
<i>BIRC2 (c-IAP1)</i>	0.141
<i>BIRC7 (ML-IAP)</i>	0.025
<i>BIRC8 (Ts-IAP)</i>	-0.002
<i>BIRC6 (Survivina)</i>	-0.249

Tabla 9. Coeficiente de correlación de Pearson de la coexpresión de NR3C1 frente a la familia de genes IAP. Coeficiente de correlación de Pearson de la coexpresión del RNAm de NR3C1 (receptor de glucocorticoides) contra los ocho miembros de genes de mamífero de la familia IAP, en datos de muestras tumorales de pacientes con cáncer de mama de la base de datos del carcinoma de mama invasivo (TCGA, provisional) cBioportal [17, 36].

Fue interesante observar que el tratamiento con TNF produjo un aumento en todos los transcritos siendo nuevamente los que más aumentaron c-IAP1 y Ts-IAP. Este efecto del TNF parecería contradictorio considerando que el TNF en este modelo es un inductor de muerte, sin embargo, dado que el TNF

también activa el sistema de NF- κ B, éste podría activar en forma directa o indirecta la expresión de estos genes de sobrevivencia.

Los niveles de expresión de RNAm de la mayoría de las IAPs fue mayor en el tratamiento con la combinación CORT + TNF que con la combinación DEX + TNF (figura 16), y algo semejante se observó a nivel de proteína para c-IAP1 y XIAP (figura 15b, 15d, 15f y 15h). Sin embargo, esta diferencia no se manifiesta con la misma magnitud en el efecto protector (figura 11c), lo que podría sugerir que las IAPs contribuyen al efecto protector pero no logran neutralizar totalmente el efecto citotóxico del TNF. Queda por analizar la presencia y eficiencia de elementos de respuesta para glucocorticoides en los promotores de la familia IAP.

Es interesante observar que los glucocorticoides solo indujeron un aumento en los niveles de RNAm de algunas IAPs (Testicular-IAP, Melanoma-IAP, Survivin y cIAP-1). El TNF solo tuvo un efecto selectivo, induciendo solo la Testicular-IAP y la c-IAP1 y ejercieron un efecto leve en otras IAPs. Sin embargo, el tratamiento combinado de DEX + TNF parece tener un efecto aditivo. En contraste, la combinación de CORT + TNF parece tener un efecto sinérgico en los niveles de expresión de IAPs, especialmente para la Survivina y la Neuronal-IAP (figura 16).

El aumento relativo en la expresión de la XIAP y la c-IAP1 al ser evaluado mediante el inmunoensayo tipo Western blot mostró los niveles de proteína de estas dos IAPs no tan exacerbado como sus niveles de RNAm. Una posible explicación para esto podrían ser los efectos reguladores postranscripcionales, como la estabilidad del RNAm, la selección de transcritos de RNAm para la traducción y la alta rotación de las proteínas después de la traducción. Es interesante que Nestal de Moraes et al., mostraron que el tratamiento con doxorrubicina en las células MCF7 produjeron efectos poco correlacionados en los niveles de RNAm y la proteína de Survivina y la de XIAP [59]. Además, Chunsen Xu et al., informaron que los niveles de RNAm y proteína de Survivina no se correlacionan en los tejidos tumorales de cáncer de mama, pero los niveles de RNAm son un predictor de mal pronóstico en pacientes con cáncer de mama [60].

Los resultados con los siRNAs mostraron que la presencia de las dos IAPs evaluadas (c-IAP1 y XIAP) es importante para la protección conferida por los glucocorticoides. La discrepancia entre la magnitud con la que disminuye la expresión de las IAPs, 89 a 91% en la figura 17a y 17b y la pérdida de protección de 18.6 a 28.2% en la figura 17c, sugiere la participación de otros mecanismos relacionados a la protección celular.

La expresión transitoria de siRNA contra la c-IAP1 y la XIAP condujo a una disminución significativa en el contenido de su proteína (figuras 17a y 17b) y fue suficiente para interferir con la protección conferida por cortisol y dexametasona. Es interesante observar que la interferencia contra la XIAP posee un efecto más fuerte en comparación con c-IAP1 (figura 17c).

Teniendo en cuenta que la protección de los glucocorticoides contra la citotoxicidad mediada por el TNF se correlaciona con un nivel sostenido de IAPs, es probable que la protección sea el resultado de un efecto combinado de al menos estas dos IAPs. Este resultado proporciona apoyo para la observación original de Messmer [15] en la que la dexametasona protege contra la citotoxicidad mediada por TNF al tiempo que mantiene el contenido de proteínas IAPs. Resultados similares han sido reportados para la dexametasona en línea celular tumoral humana A549 de pulmón, protegiendo contra TRAIL y contra drogas anticancerosas a través de la expresión de la c-IAP2 [63]. En estudios *in vivo*, se ha informado que la dexametasona interfiere con la apoptosis en el sistema nervioso central y en las células germinales testiculares [64]. Es probable que, en estas condiciones *in vitro* e *in vivo*, la expresión de las diversas formas de protección mediada por las IAPs (c-IAP1 y XIAP) contra la apoptosis o la citotoxicidad mediada por fármacos cancerígenos; en consecuencia, el uso de glucocorticoides como antieméticos podría antagonizar el efecto cito-reductor de la quimioterapia.

Sin embargo, si el efecto antiapoptótico de los glucocorticoides se produjera en un entorno más relevante desde el punto de vista clínico, como en la citotoxicidad mediada por fármacos contra el cáncer, sería un área de intenso debate [7]. Los glucocorticoides son los antieméticos más comunes y se administran poco antes de la quimioterapia para contrarrestar los efectos secundarios de la quimioterapia [6]. En el caso de las células MCF7, modelo que representa el cáncer de mama luminal A, la evidencia *in vitro* sugiere que los glucocorticoides inhiben el efecto del paclitaxel [65]. Sin embargo, los glucocorticoides por sí solos tienen efectos anticancerígenos, como la inhibición de la angiogénesis *in vitro* [66] y la proliferación celular [67]; este último efecto fue recientemente asociado con la capacidad que tienen las células para restablecer la expresión de los genes del reloj como *BMAL* [50], aunque esto aún no se ha demostrado en el caso de las células de cáncer de mama. El momento de la administración de la quimioterapia también podría ser relevante para su efectividad, teniendo en cuenta la naturaleza circadiana de los niveles séricos de cortisol [41]. Además, estudios en humanos que evalúen el efecto de los glucocorticoides en la efectividad de la quimioterapia en pacientes con cáncer de mama, hasta donde sabemos, aún no se han llevado a cabo.

CONCLUSIONES

La terapia hormonal en el cáncer de mama se limita a la inhibición de la señalización de estrógenos. La evidencia acumulada apunta a un papel para los glucocorticoides endógenos y exógenos en la progresión tumoral. Aquí destacamos el papel de las proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAPs) en el mecanismo por el cual el cortisol y la dexametasona interfieren con el efecto de citotoxicidad mediado por TNF en las células de cáncer de mama MCF7 (figura 20). También mostramos que las proteínas IAPs se correlacionan con la expresión del receptor de glucocorticoides, utilizando datos públicos de transcriptoma de tumores de pacientes. Nuestro estudio debería motivar más el análisis sobre la administración de glucocorticoides o anti-glucocorticoides a pacientes con cáncer de mama durante su tratamiento. Además, sugerimos que la expresión del gen del receptor de glucocorticoides (*NR3C1*) y de los genes *c-IAP1* y *XIAP* podrían evaluarse como marcadores pronóstico para la terapia del cáncer de mama.

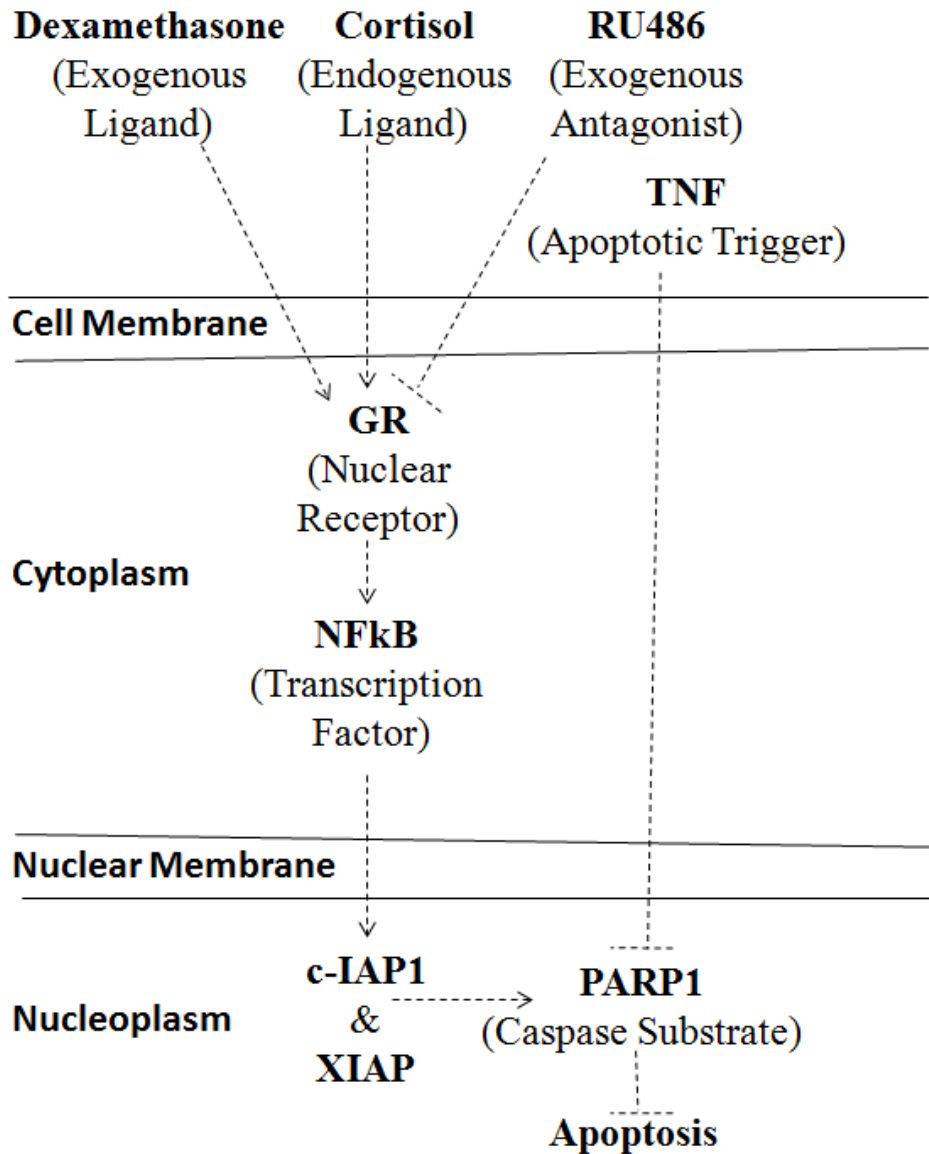


Figura 20. Mapa mecánico del efecto de TNF y glucocorticoides en células MCF7. GR α (receptor de glucocorticoides α), RU486 (mifepristona), PARP 1 (poli-ADP ribosil polimerasa 1), NF- κ B (cadena ligera de factor nuclear kappa en células B), c-IAP1 (proteína de apoptosis de inhibidor celular 1), XIAP (Proteína de apoptosis del inhibidor del cromosoma X) y TNF (factor de necrosis tumoral).

BIBLIOGRAFÍA

1. Mueller C, Haymond A, Davis JB, Williams A, Espina V. Protein biomarkers for subtyping breast cancer and implications for future research. *Expert Rev Proteomics* 2018; 15:131–152.
2. Louie MC, Sevigny MB. Steroid hormone receptors as prognostic markers in breast cancer. *Am J Cancer Res* 2017; 7:1617–1636.
3. Abduljabbar R, Negm OH, Lai C-F, Jerjees DA, Al-Kaabi M, Hamed MR, Tighe PJ, Buluwela L, Mukherjee A, Green AR, Ali S, Rakha EA, Ellis IO. Clinical and biological significance of glucocorticoid receptor (GR) expression in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2015; 150:335–346.
4. Van Cauter E, Leproult R, Kupfer DJ. Effects of gender and age on the levels and circadian rhythmicity of plasma cortisol. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81:2468–2473.
5. Eismann EA, Lush E, Sephton SE. Circadian effects in cancer-relevant psychoneuroendocrine and immune pathways. *Psychoneuroendocrinology* 2010; 35:963–976.
6. Ettinger DS, Berger MJ, Aston J, Barbour S, Bergsbaken J, Brandt D, Crews JR, Jeong-Kim E, Kirkegaard S, Kloth DD, Klute K. Antiemesis. *Natl Compr Cancer Netw* 2018; 62.
7. Maurice-Dror C, Perets R, Bar-Sela G. Glucocorticoids as an adjunct to oncologic treatment in solid malignancies – Not an innocent bystander. *Crit Rev Oncol Hematol* 2018; 126:37–44.
8. Volden PA, Conzen SD. The influence of glucocorticoid signaling on tumor progression. *Brain Behav Immun* 2013; 30:S26–S31.

9. Buxant F, Kindt N, Laurent G, Noël J-C, Saussez S. Antiproliferative effect of dexamethasone in the MCF-7 breast cancer cell line. *Mol Med Rep* 2015; 12:4051–4054.
10. Crozier M, Porter LA. Paclitaxel-induced transcriptional regulation of Fas signaling pathway is antagonized by dexamethasone. *Breast Cancer Res Treat* 2015; 154:33–44.
11. Zhang C, Beckermann B, Kallifatidis G, Liu Z, Rittgen W, Edler L, Büchler P, Debatin K-M, Büchler MW, Friess H, Herr I. Corticosteroids induce chemotherapy resistance in the majority of tumour cells from bone, brain, breast, cervix, melanoma and neuroblastoma. *Int J Oncol* 2006; 29:1295–301.
12. Mikosz CA, Brickley DR, Sharkey MS, Moran TW, Conzen SD. Glucocorticoid receptor-mediated protection from apoptosis is associated with induction of the serine/threonine survival kinase gene, *sgk-1*. *J Biol Chem* 2001; 276:16649–54.
13. Wu W, Chaudhuri S, Brickley DR, Pang D, Karrison T, Conzen SD. Microarray analysis reveals glucocorticoid-regulated survival genes that are associated with inhibition of apoptosis in breast epithelial cells. *Cancer Res* 2004; 64:1757–64.
14. Cai Z, Capoulade C, Moyret-Lalle C, Amor-Gueret M, Feunteun J, Larsen a K, Paillerets BB, Chouaib S. Resistance of MCF7 human breast carcinoma cells to TNF-induced cell death is associated with loss of p53 function. *Oncogene* 1997; 15:2817–2826.
15. Messmer UK, Pereda-Fernandez C, Manderscheid M, Pfeilschifter J. Dexamethasone inhibits TNF-alpha-induced apoptosis and IAP protein downregulation in MCF-7 cells. *Br J Pharmacol* 2001; 133:467–476.
16. Machuca C, Mendoza-Milla C, Córdova E, Mejía S, Covarrubias L, Ventura J, Zentella A. Dexamethasone protection from TNF-alpha-induced cell death in MCF-7 cells requires NF-kappaB and is independent from AKT. *BMC Cell Biol* 2006; 7:9.

17. Cerami E, Gao J, Dogrusoz U, Gross BE, Sumer SO, Aksoy BA, Jacobsen A, Byrne CJ, Heuer ML, Larsson E, Antipin Y, Reva B, Goldberg AP, Sander C, Schultz N. The cBio Cancer Genomics Portal: An open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discov* 2012; 2:401–404.
18. Lewin Benjamin. *Genes VII*. 2000; Oxford University Press
19. Ochoa Carrillo F. J. *Gaceta Mexicana de Oncología*. Colima México 2017.
20. Secretaria de Salud. Dirección General de Información en Salud. Proyecciones 2014-2020. *Revista Latinoamericana de Medicina Conductual*. Vol. 8, Núm. 1, 2017.
21. Dumitrescu RG and Cotaria I. Understanding breast cancer risk-where do we stand in 2005? *J Cell Mol Med* 2005; 9:208-221
22. Lodish H., Berk A., Matsudaira P., Scott MP., Zipursky SL., and Darnel. *Molecular Cell Biology* 2004. Freeman and Company. New York, USA.
23. Mitre Aguilar IB. Perfil de proteínas nucleares en células de cáncer de mama y durante su protección antiapoptótica por dexametasona. Tesis; UNAM 2008.
24. American Society of Clinical Oncology, ASCO, 2003
25. Doping, Performance-Enhancing Drugs, and Hormones in Sport. *Glucocorticoids*, 2018. Elsevier Inc. All rights reserved. Chapter 4. DO I: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813442-9.00004-3>.
26. Cosío B.G. , Torrego A. y Adcock I.M. Mecanismos moleculares de los glucocorticoides. *Arch Bronconeumol* 2005; 41(1):34-41
27. Guerrero, J. Para entender la acción de cortisol en inflamación aguda: una mirada desde la glándula suprarrenal hasta la célula blanco. *Revista médica de Chile* 2017; 145(2):

230-239.

28. Ortega-Domínguez, B., Herrera-Ramírez, M., & Tecalco-Cruz, A. C. Receptores nucleares: del núcleo al citoplasma. *TIP Rev.Esp.Cienc.Quím.Biol* 2015; 18(2): 131–143. doi:10.1016/j.recqb.2015.09.005
29. Pawlak, M. , Lefebvre, P., & Staels, B. General Molecular Biology and Architecture of Nuclear Receptors. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 2012; 12(6), 486–504. doi:10.2174/156802612799436641
30. Giannetti L, Consolo U, Magnoni C y Musio L. Apoptosis: Escaping strategies in human skin cancer. *Oncol. Rep* 2004; 11: 401 405
31. Danial NN. y Korsmeyer SJ. Cell Death: Critical control points. *Cell* 2004; 116: 205-219.
32. Rickard JA, Anderton H, Etemadi N, Nachbur U, Darding M, Peltzer N, Lalaoui N, Lawlor KE, Vanyai H, Hall C, Bankovacki A, Gangoda L, Wong WW, Corbin J, Huang C, Mocarski ES, Murphy JM, Alexander WS, Voss AK, Vaux DL, Kaiser WJ, Walczak H, Silke J. TNFR drives inflammation in Sharpin-deficient mice. *Elife* 2014 Dec 2;3. doi: 10.7554/eLife.03464.
33. Hunter Allison M, LaCasse Eric C., Korneluk Robert G. The inhibitors of apoptosis (IAPs) as cancer targets. *Apoptosis* 2007; 12:1543–1568
34. Schimmer AD, Dalili S, Batey RA and Riedl SJ. XIAP inhibitors for the treatment of malignancy. *Cell Death and Differentiation* 2006; 13:179–188
- 35 Stanley M. Hollenberg, Cary Weinberger, Estelita S. Ong, Gail Cerelli, Anthony Oro, Roger Lebo, E. Brad Thompson, Michael G. Rosenfeld, and Ronald M. Evans. Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA. *Nature*.

1985; 318(6047): 635–641

36. Gao J, Aksoy BA, Dogrusoz U, Dresdner G, Gross B, Sumer SO, Sun Y, Jacobsen A, Sinha R, Larsson E, Cerami E, Sander C, Schultz N. Integrative Analysis of Complex Cancer Genomics and Clinical Profiles Using the cBioPortal. *Sci Signal* 2013; 6:p11-p11.
37. Barrios-García T, Gómez-Romero V, Tecalco-Cruz Á, Valadéz-Graham V, León-Del-Río A. Nuclear tristetraprolin acts as a corepressor of multiple steroid nuclear receptors in breast cancer cells. *Mol Genet Metab Reports* 2016; 7:20–6.
38. Jarman EJ, Ward C, Turnbull AK, Martinez-Perez C, Meehan J, Xintaropoulou C, Sims AH, Langdon SP. HER2 regulates HIF-2 α and drives an increased hypoxic response in breast cancer. *Breast Cancer Res* 2019; 21.
39. Hardy RS, Raza K, Cooper MS. Endogenous glucocorticoids in inflammation: contributions of systemic and local responses. *Swiss Med Wkly* 2012; 142:1–10.
40. Hall JE. *Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology Twelfth Edition*. Twelfth. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2011.
41. Ota T, Fustin JM, Yamada H, Doi M, Okamura H. Circadian clock signals in the adrenal cortex. *Mol Cell Endocrinol* 2012; 349:30–37.
42. Hyatt PJ, Bhatt K, Tait JF. Steroid biosynthesis by zona fasciculata and zona reticularis cells purified from the mammalian adrenal cortex. *J Steroid Biochem* 1983; 19:953–959.
43. Raux-Demay MC, Pierret T, D'yvoire MB, Bertagna X, Girard F. Transient inhibition of RU 486 antiglucocorticoid action by dexamethasone. *J Clin Endocrinol Metab* 1990; 70:230–233.
44. Ambrogio AG, Cavagnini F. Role of “old” pharmacological agents in the treatment of Cushing’s syndrome. *J Endocrinol Invest* 2016; 39:957–965.

45. So AYL, Chaivorapol C, Bolton EC, Li H, Yamamoto KR. Determinants of cell- and gene-specific transcriptional regulation by the glucocorticoid receptor. *PLoS Genet* 2007; 3:0927–0938.
46. Block TS, Murphy TI, Munster PN, Nguyen DP, Lynch FJ. Glucocorticoid receptor expression in 20 solid tumor types using immunohistochemistry assay. *Cancer Manag Res* 2017; 9:65–72.
47. Buxant F, Engohan-aloghe C, Noe J. Estrogen Receptor , Progesterone Receptor , and Glucocorticoid Receptor Expression in Normal Breast Tissue , Breast In Situ Carcinoma , and Invasive Breast Cancer. 2010; 18:254–257.
48. Skor MN, Wonder EL, Kocherginsky M, Goyal A, Hall BA, Cai Y, Conzen SD. Glucocorticoid receptor antagonism as a novel therapy for triple-negative breast cancer. *Clin Cancer Res* 2013; 19:6163–72.
49. Dai X, Li T, Bai Z, Yang Y, Liu X, Zhan J, Shi B. Breast cancer intrinsic subtype classification, clinical use and future trends. *Am J Cancer Res* 2015; 5:2929–43.
50. Catteau X, Simon P, Buxant F, Noël J-C. Expression of the glucocorticoid receptor in breast cancer-associated fibroblasts. *Mol Clin Oncol* 2017; 5:372–376.
51. Hegde SM, Kumar MN, Kavya K, Kumar KMK, Nagesh R, Patil RH, Babu RL, Ramesh GT, Sharma SC. Interplay of nuclear receptors (ER, PR, and GR) and their steroid hormones in MCF-7 cells. *Mol Cell Biochem* 2016; 422:109–120.
52. Webster JC, Huber RM, Hanson RL, Collier PM, Haws TF, Mills JK, Burn TC, Allegretto EA. Dexamethasone and tumor necrosis factor- α act together to induce the cellular inhibitor of apoptosis-2 gene and prevent apoptosis in a variety of cell types. *Endocrinology* 2002; 143:3866–3874.

53. Lin KT, Wang LH. New dimension of glucocorticoids in cancer treatment. *Steroids* 2016; 111:84–88.
54. Keith BD. Systematic review of the clinical effect of glucocorticoids on nonhematologic malignancy. *BMC Cancer* 2008; 8:84
55. Pan D, Kocherginsky M, Conzen SD. Activation of the glucocorticoid receptor is associated with poor prognosis in estrogen receptor-negative breast cancer. *Cancer Res* 2011; 71:6360–6370.
56. Sarlis NJ, Bayly SF, Szapary D, Simons SS. Quantity of partial agonist activity for antiglucocorticoids complexed with mutant glucocorticoid receptors is constant in two different transactivation assays but not predictable from steroid structure. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1999; 68:89–102.
57. Moffitt KL, Walker B, Martin SL. Chymotrypsin-like serine proteinases are involved in the maintenance of cell viability. *Biochimie* 2012; 94:2582–2589.
58. Scott FL, Denault JB, Riedl SJ, Shin H, Renucci M, Salvesen GS. XIAP inhibits caspase-3 and -7 using two binding sites: Evolutionary conserved mechanism of IAPs. *EMBO J* 2005; 24:645–655.
59. Nestal de Moraes G, Vasconcelos FC, Delbue D, Mognol GP, Sternberg C, Viola JPB, Maia RC. Doxorubicin induces cell death in breast cancer cells regardless of Survivin and XIAP expression levels. *Eur J Cell Biol* 2013; 92:247–56.
60. Xu C, Yamamoto-Ibusuki M, Yamamoto Y, Yamamoto S, Fujiwara S, Murakami K, Okumura Y, Yamaguchi L, Fujiki Y, Iwase H. High survivin mRNA expression is a predictor of poor prognosis in breast cancer: a comparative study at the mRNA and protein level. *Breast Cancer* 2014; 21:482–490.

61. Silke J, Meier P. Inhibitor of apoptosis (IAP) proteins-modulators of cell death and inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2013; 5: (2) 1-21.
62. Mendoza-Milla C, Machuca Rodríguez C, Córdova Alarcón E, Estrada Bernal A, Toledo-Cuevas EM, Martínez Martínez E, Zentella Dehesa A. NF-kappaB activation but not PI3K/Akt is required for dexamethasone dependent protection against TNF-alpha cytotoxicity in L929 cells. *FEBS Lett* 2005; 579:3947–52.
63. Kim YS, Park JS, Jee YK, Lee KY. Dexamethasone inhibits TRAIL- and anti-cancer drugs-induced cell death in A549 cells through inducing NF-kappaB-independent cIAP2 expression. *Cancer Res Treat* 2004; 36:330–337.
64. Lee I-N, Cheng W-C, Chung C-Y, Lee M-H, Lin MH-C, Kuo C-H, Weng H-H, Yang J-T. Dexamethasone reduces brain cell apoptosis and inhibits inflammatory response in rats with intracerebral hemorrhage. *J Neurosci Res* 2015; 93:178–188.
65. Buxant F, Kindt N, Noël JC, Laurent G, Saussez S. Preexposure of MCF-7 breast cancer cell line to dexamethasone alters the cytotoxic effect of paclitaxel but not 5-fluorouracil or epirubicin chemotherapy. *Breast Cancer Targets Ther* 2017; 9:171–175.
66. Ozmen A, Unek G, Kipmen-Korgun D, Mendilcioglu I, Sanhal C, Sakinci M, Korgun ET. Glucocorticoid effects on angiogenesis are associated with mTOR pathway activity. *Biotech Histochem* 2016; 91:296–306.
67. Courtin A, Communal L, Vilasco M, Cimino D, Mourra N, De Bortoli M, Taverna D, Faussat AM, Chaouat M, Forgez P, Gompel A. Glucocorticoid receptor activity discriminates between progesterone and medroxyprogesterone acetate effects in breast cells. *Breast Cancer Res Treat* 2012; 131:49–63.

68. Kiessling S, Beaulieu-Laroche L, Blum ID, Landgraf D, Welsh DK, Storch K-F, Labrecque N, Cermakian N. Enhancing circadian clock function in cancer cells inhibits tumor growth. *BMC Biol* 2017; 15:13.
69. Dreos R, Ambrosini G, Périer RC, Bucher P. The Eukaryotic Promoter Database: expansion of EPD new and new promoter analysis tools. *Nucleic Acids Res* 2015; 43:D92–D96.
70. Dreos R, Ambrosini G, Groux R, Cavin Périer R, Bucher P. The eukaryotic promoter database in its 30th year: focus on non-vertebrate organisms. *Nucleic Acids Res* 2017; 45: D51–D55.



OF. CPCB/486/2019

C.P. AGUSTÍN MERCADO

Director de Certificación y Control Documental
Dirección General de Administración Escolar
Universidad Nacional Autónoma de México
Presente

Por medio del 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 29 de abril del año en curso, acordó aprobar el Artículo publicado en la Revista BMC Cancer "**GLUCOCORTICOID-DEPENDENT EXPRESSION OF IAP PARTICIPATES IN THE PROTECTION AGAINST TNF-MEDIATED CYTOTOXICITY IN MCF7 CELLS**" presentado por la alumna de Doctorado en Ciencias **IRMA BEATRIZ MITRE AGUILAR** con número de cuenta 77314208.

De acuerdo con lo anterior, el Artículo cubre el punto 3.4.7. inciso c) Requisitos para obtener el grado de Doctora del Posgrado en Ciencias Biológicas, y así la alumna pueda solicitar el examen de grado correspondiente.

Agradeciendo la atención que se sirva dar al presente sin más por el momento le envío un cordial saludo.

Atentamente

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"

Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 30 de abril del 2019

DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA
COORDINADOR

RESEARCH ARTICLE

Open Access



Glucocorticoid-dependent expression of IAP participates in the protection against TNF-mediated cytotoxicity in MCF7 cells

Irma B. Mitre-Aguilar^{1,3} , Tonatiuh Barrios-Garcia^{2,5} , Victor M. Ruiz-Lopez⁶ , Alberto J. Cabrera-Quintero^{1,3} , Nancy R. Mejia-Dominguez⁷ , Jose L. Ventura-Gallegos^{1,3} , Daniel Moreno-Mitre³ , Alejandro Aranda-Gutierrez³ , Janini Mejia-Rangel^{1,3} , Alma R. Escalona-Guzman^{1,3} , Yanin Chavarri-Guerra⁸ , Alfonso Leon-Del-Rio^{2,5} , and Alejandro Zentella-Dehesa^{1,2,3,4*} 

Abstract

Background: Glucocorticoid receptor (GR) activation has been associated with breast cancer cell survival in vitro. Glucocorticoid (GC)-dependent protection against tumor necrosis factor (TNF)-induced cell death has been well characterized in MCF7 luminal A breast cancer cells. The GR activates a variety of protective mechanisms, such as inhibitors of apoptosis proteins (IAPs). However, the relative contribution of the GR-dependent expression of IAPs in the protection of cell death has not, to our knowledge, been evaluated.

Methods: MCF7 cells were used for all experiments. GR was activated with cortisol (CORT) or dexamethasone (DEX) and inhibited with mifepristone (RU486). Cell viability was determined in real-time with the xCELLigence™ RTCA System and at specific endpoints using crystal violet stain. The mRNA levels of the eight members of the IAP family were measured by qRT-PCR. The protein levels of GR, PR, ER α , HER2, PARP1, c-IAP1 and XIAP were evaluated by Western blot analysis. The knockdown of c-IAP1 and XIAP was accomplished via transient transfection with specific siRNAs. GR activation was verified by a gene reporter assay. Via the cBioportal interphase we queried the mRNA levels of GR and IAPs in breast cancer tumors.

Results: RU486 significantly inhibited the anti-cytotoxic effect of both GCs. PARP1 processing was diminished in the presence of both GCs. The combined treatments of GCs + TNF increased the relative mRNA levels of Survivin > c-IAP1 > NAIP > Apollon > XIAP > Ts-IAP > ML-IAP > c-IAP2. Additionally, GR mRNA content increased with the combined treatments of GCs + TNF. Sustained levels of the proteins c-IAP1 and XIAP were observed after 48 h of the combined treatments with GCs + TNF. With *c-IAP1* and *XIAP* gene silencing, the GC-mediated protection was diminished. In the breast tumor samples, the GR mRNA was coexpressed with Apollon and XIAP with a Pearson coefficient greater than 0.3.

Conclusions: The effect of GCs against TNF-mediated cytotoxicity involves increased mRNA expression and sustained protein levels of c-IAP1 and XIAP. The antagonist effects of RU486 and the qRT-PCR results also suggest the role of the GR in this process. This finding may have clinical implications because the GR and IAPs are expressed in breast tumor samples.

Keywords: Cell death, Glucocorticoid receptor, Glucocorticoids, Inhibitor of apoptosis proteins, Tumor necrosis factor, MCF7 cells

* Correspondence: azentell@iibiomedicas.unam.mx

¹Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biológicas (IIBO), Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), 04510 Ciudad de México (CDMX), México, México

²Programa de Investigación en Cáncer de Mama, IIBO, UNAM, 04510 México, CDMX, México

Full list of author information is available at the end of the article



Background

The expression of hormone receptors (ER α receptor and PR β receptor) and the HER2 receptor are key biomarkers for breast cancer subtyping, prognosis, and therapy [1]. However, breast cancer cells express additional families of hormone receptors, especially the nuclear receptor superfamily [2]. The nuclear expression of glucocorticoid (GC) receptors (GRs) in breast cancer samples of all intrinsic subtypes has been demonstrated by immunohistochemistry (IHC). However, GR expression levels might vary according to estrogen and progesterone expression and tumor grade. The prognostic value of GR expression over other clinical features has not been proven [3]. Breast cancer patients are continuously exposed to GR agonists. For example, cortisol (CORT) is present in the blood of patients with breast cancer regardless of age; this represents a sharp contrast to estrogen levels [4]. It has been reported that the deregulation of circadian rhythms may increase CORT exposure time in breast cancer patients [5]. Additionally, to manage the secondary effects of chemotherapy, breast cancer patients are administered synthetic GR agonists, especially dexamethasone (DEX) [6]. GR agonists, such as CORT and DEX, exert pleiotropic effects on the breast tumor microenvironment [7]. Due to the relevance of CORT and DEX in cancer, their effects on cancer cell proliferation and death have been extensively studied [8]. However, the results of these studies are an intense area of debate. Some studies point out that GCs hinder proliferation [9], while others indicate that GCs induce proliferation [10]. However, current evidence suggests that GCs consistently counteract the effect of cytotoxic agents, reducing cell death [11]. The mechanism by which GCs confer protection against cell death has not been fully elucidated. However, the use of small interfering RNA (siRNA) to inhibit the expression of the kinase SGK1 [12] and the phosphatase dual specificity phosphatase 1 (DUSP1) [13] revealed that these two enzymes are necessary for the GC-mediated protective effect. Moreover, GC treatment induced the downregulation of the nuclear factor-kappa beta (NF- κ B)--dependent expression of first apoptosis signal receptor (FAS) [10]. The current understanding of the GC-induced interference with cell death is well documented in experiments where tumor necrosis factor (TNF) is used to cause cell death [14]. Previously, it was established that MCF7 cells express cell inhibitor of apoptosis proteins (IAPs), such as cell-IAP-1 (c-IAP1) and X chromosome-linked IAP (XIAP) [15]. TNF treatment decreases the expression of these IAPs, and DEX prevents this decrease in an NF- κ B-dependent manner [16]. Therefore, we tested the protective effect of CORT as well as DEX, and we evaluated the relative participation of c-IAP1 and

XIAP in the interference of GC-mediated cell death with transient RNAi.

Methods

Materials

CORT, DEX, and RU486 were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), and human recombinant TNF was obtained from R&D Systems, Inc. (Minneapolis, MN, USA). Cell culture media and sera were obtained from Invitrogen Life Technologies (San Diego, CA, USA). Rabbit polyclonal IgG antibodies against c-IAP1 and XIAP were obtained from Upstate (Merck, Darmstadt, Germany). Protease inhibitor cocktail tablets were obtained from Boehringer Mannheim (East Sussex, UK). Secondary antibodies were purchased from Pierce Biotechnology, Inc. (Rockford, IL, USA) (anti-rabbit IgG) and Zymed Laboratories (Carlsbad, CA, USA) (anti-mouse and anti-goat IgG). The SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate was purchased from ThermoFisher Scientific (Waltham, MA, USA). The *Escherichia coli* DH5 α strain was obtained from Gibco BRL (Paisley, UK) and was subcloned into the expression vector pcDNA3.1-GR under the control of the cytomegalovirus pCMV- β Gal promoter.

Plasmids

The pcDNA3.1-GR and GRE-Tk-LUC vectors were kindly provided by Dr. W. Lee Kraus (Cornell University), amplified by RT-PCR and cloned into the mammalian expression vector pcDNA3.1 from Invitrogen (Carlsbad, CA, USA).

Cell culture

The luminal A breast cancer cell line MCF7 (ATCC® HTB-22™) containing nuclear GR (see Additional file 4) was obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA) and maintained in minimum Eagle's medium supplemented with 10% (v/v) inactivated fetal bovine serum (FBS) (GIBCO, Rockville MD, USA), 100 U/mL penicillin, 100 μ g/mL streptomycin, and 0.25 μ g/mL amphotericin B (GIBCO, Rockville MD, USA) in a humidified atmosphere containing 5% CO $_2$ at 37 °C.

Cell death assay

The MCF7 (1.5×10^4 /cm 2) cell line was stimulated with a final concentration of 10 μ M of CORT, DEX, or RU486 and/or 10 ng/mL of human recombinant TNF. Cell viability was measured by a crystal violet staining assay in a 48-well plate, and cells were fixed at 24, 48, and 72 h after cell treatment, with the addition of 200 μ L of 1.1% glutaraldehyde at the end of each experiment. Afterwards, the plates were stained with 500 μ L of crystal violet staining solution (0.1% crystal violet in 10% formic

acid) for 20 min. The excess crystal violet staining solution was removed with distilled water, and the cells were air-dried. The crystal violet stain bound to the samples was dissolved with 500 μ L of 10% acetic acid. Then, 150 μ L of the solution was placed into 96-well plates and quantified at 590 nm in an ELISA plate reader.

xCELLigence™ viability assay

Dynamic monitoring of MCF7 cell viability was performed with the xCELLigence™ RTCA System. (ACEA Biosciences, San Diego CA, USA). MCF7 cells were seeded (1.5×10^4 cells/cm²) on an E-plate-16 at the optimal cell density for the cell proliferation assay. Cell growth curves were recorded on the xCELLigence™ RTCA System in real-time every 30 min. Cells adhered to the bottom of each well, covering the surface of the sensor that monitors cells by measuring their normalized cell index (NCI). The NCI was dynamically recorded in real-time without labeling the cells. The RTCA DP instrument utilizes the E-plate-16 for the cell death assay. Impedance is correlated with an increase in the number of cells that are on the underside of the well by measuring NCI.

Gene reporter assay

MCF7 cells (2×10^5) were seeded into six-well tissue culture dishes containing phenol red-free RPMI supplemented with 10% charcoal/dextran-treated FBS (stripped FBS) and cultured for 24 h. Then, the cells were transfected by employing the calcium phosphate-DNA [Ca₃(PO₄)₂] coprecipitation method, which typically included 2 g of GRE-Tk-LUC reporter, 0.1 g of pCMV- β Gal (transfection control), and 0.25–1.0 μ g pcDNA3.1-GR or another test vector. After 6 h, the cells were washed twice with a phosphate-buffered saline (PBS) solution and treated with either 10 μ M of CORT, 10 μ M of DEX, 10 ng/mL of TNF, or carrier (0.01% ethanol) for 24 h in phenol red-free RPMI supplemented with 5% stripped FBS. The cells were then washed and harvested in a potassium phosphate lysis buffer containing 1% Triton X-100. Luciferase and β -galactosidase activities were measured using a Monolight 3010 Luminometer (Pharmingen).

siRNA assay

To suppress c-IAP1 and XIAP expression, the following targeted siRNA pools were administered according to the manufacturer's instructions: human-siRNA GS331 XIAP (#1027416); human-siRNA GS329 c-IAP1 (#1027416); silencer negative control-siRNA (#1027280); and cell death control-siRNA (#1027298). The siRNAs and the transfection reagent (#301705) were obtained from QIAGEN Biotechnology (Cambridge, MA, USA). The reduction in c-IAP1 and XIAP expression was

determined by Western blot (WB) analysis employing anti-c-IAP1 and anti-XIAP antibodies.

Western blot analysis

MCF7 cells (1.5×10^4 cells/cm²) were cultured in 100 mm cell culture dishes for 24 h after stimulation with 10 μ M of CORT, 10 μ M of DEX, and/or 10 ng/mL of TNF. The cells were lysed at predetermined intervals after treatment: 1, 3, 6, 12, 24, and 48 h. To detect nuclear receptors, we used BT-474 cells (ATCC® HTB-20™, ductal carcinoma HER2/neu-positive cells). Cell extracts were lysed in RIPA buffer (50 mM of Tris, 5 mM of EDTA, 150 mM of NaCl, 0.5% of Nonidet-40, 1 mM of PMSE, pH 8.0) followed by centrifugation (4000 *g* for 5 min). The protein concentrations in total cell lysates were measured using the Bradford assay with bovine serum albumin (BSA) as the standard curve. Whole cell lysates (30 μ g) were eluted with 5X Laemmli buffer, electrophoresed in 10% Tris-glycine polyacrylamide gels, and separated by SDS-PAGE. WB analysis was performed using the following specific primary rabbit polyclonal IgG antibodies: anti-c-IAP1 (1:1500 dilution; Upstate catalog #07–759; Merck, Darmstadt, Germany); anti-XIAP (1:2000 dilution; Upstate catalog #07–753; Merck Darmstadt, Germany); anti-mature PARP1 (1:200 dilution; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA); anti-cleaved PARP1 (1:200 dilution; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA); and anti-HER2/neu receptor (1:3000 dilution; Santa Cruz Biotechnology SC-284; Dallas, Texas, USA). The following additional mouse IgG primary antibodies were used in the experiments: anti-GR α receptor (1:500 dilution; Santa Cruz Biotechnology SC-393232); anti-PR β receptor (1:100 dilution; Santa Cruz Biotechnology SC-810); anti-ER α receptor (1:250 dilution; Santa Cruz Biotechnology SC-8005); and anti- β -actin (1:10,000 dilution; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). The anti-rabbit (1:10,000 dilution), IgG (1:10,000 dilution), and anti-goat (1:5,000 dilution) secondary HRP-conjugated antibodies were purchased from Zymed (San Francisco, CA), and the anti-mouse IgG (1:15,000 dilution) was obtained from Pierce (Rockford, IL, USA). The proteins were visualized on X-ray film using an enhanced chemiluminescence assay using the SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate from ThermoFisher Scientific (Waltham, MA, USA).

qRT-PCR analysis

One microgram of total RNA was treated with 1 unit of DNase for 30 min at 37 °C. Complementary DNA (cDNA) was synthesized using a High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit from Applied-Biosystems (Foster CA, USA) according to the manufacturer's specifications. Briefly, a master mix was prepared using 50 U

of multiscribe retro-transcriptase (RT) enzyme, 0.8 μ L of dNTP mix (100 mM total), 2.0 μ L of RT buffer 10X, 3.8 U of RNase inhibitor, 1 μ L of random primers (10X), and 1 μ g of total sample RNA in a final volume of 15 μ L completed with free nuclease water. The mix was incubated at 25 °C for 10 min, followed by incubation at 37 °C for 1 h and at 85 °C for 5 s. cDNA was used to quantify transcript abundance through real-time PCR (qRT-PCR) using specific primers (Additional file 1) in a Step-One-System from Applied-Biosystems (Foster CA, USA). The amplification reaction contained 200 ng of cDNA, 7.5 μ L of a master mix (SYBR Green) from Applied-Biosystems (Foster CA, USA), 10 pmol of each primer in a final volume of 15 μ L, completed with nuclease-free water. PCR cycling conditions were 95 °C for 2 min, followed by 40 cycles of 95 °C for 15 s and 60 °C for 1 min. After 40 cycles, the Delta-CT method was performed to compare the levels of the transcripts. The results were expressed as 2 elevated to the negative power of the difference between CT-TNF and CT-IAP minus CT-ethanol (ETOH) ($2^{-\Delta\text{ct}}$). The specificity of PCR was determined with the melt curve program.

Bioinformatic analysis

The data were retrieved from a public online resource [17, 18]. Using this resource, the public and curated database The Breast Invasive Carcinoma (TCGA, provisional) was accessed. mRNA expression z-Scores (RNA-seq V2 RSEM) for *NR3C1* and for the eight members of the *IAP* gene family were selected. Because the classification of tumor samples into the luminal A, luminal B, HER2+, and triple negative breast cancer (TNBC) categories was not available, IHC data describing ER α , HER2, and PR β status were downloaded. The tumor samples were separated into the correct intrinsic subtype category based on their positive or negative status of ER α , PR β , and HER2 as determined by IHC. The scatter plot of *NR3C1* mRNA vs intrinsic subtype was created using Microsoft Excel software. The graphs and table comparing *NR3C1* with members of the *IAP* gene family were directly retrieved from the plot tab of cBioportal.

Statistical analysis

Each experiment was performed at least three times. Data are presented as the mean \pm standard deviation (SD). Data were analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Bonferroni method for multiple comparisons. A level of $*p < 0.05$ was considered statistically significant.

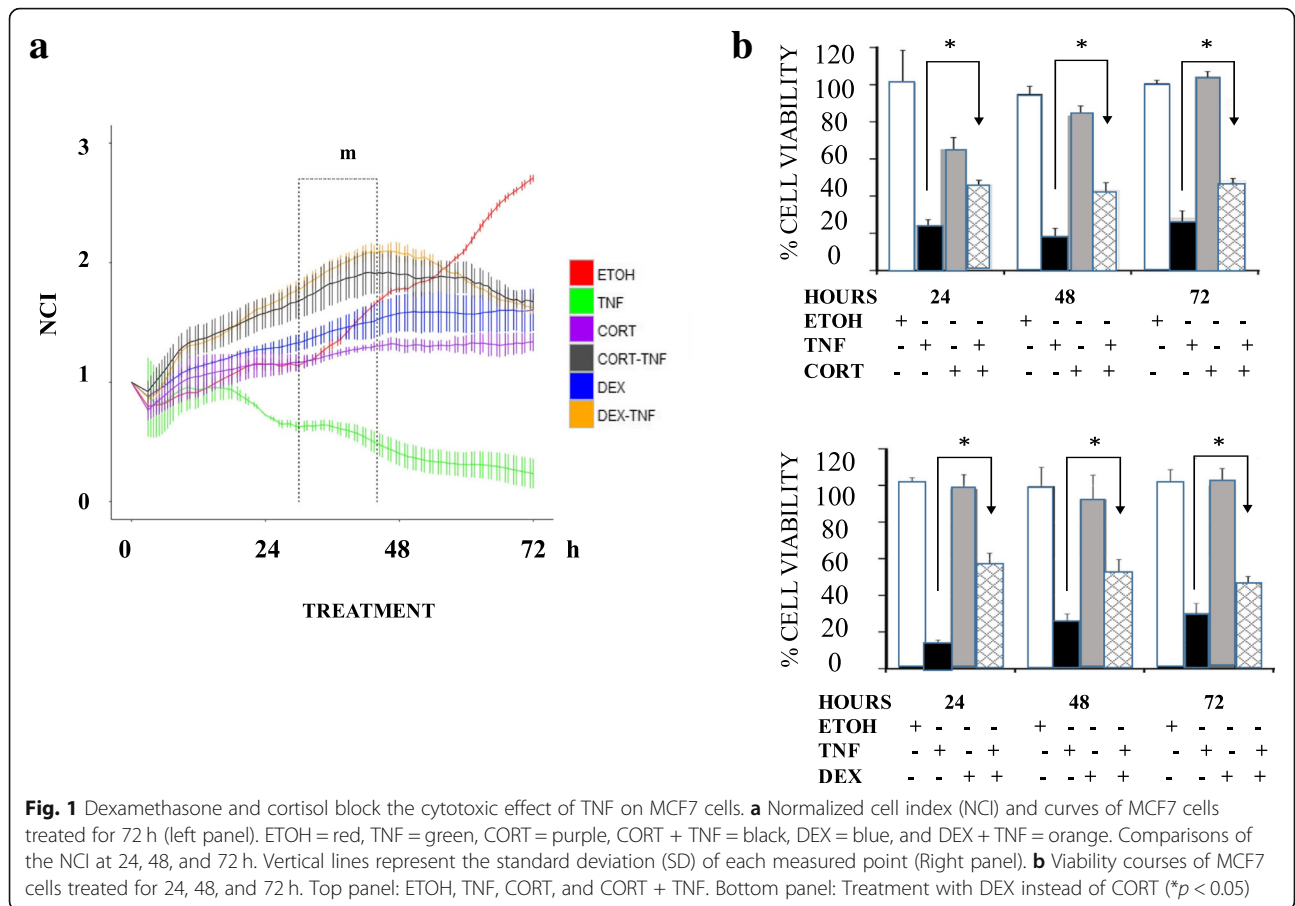
For two siRNA experiments, the effect of the treatment on cell viability for each siRNA was examined with ANOVA. In the case of c-IAP1 and XIAP, we employed

a general linear model (GLM) with gamma error distribution. Additionally, we examined the interaction of siRNA type and treatment through deviance analysis. Tukey post hoc analysis was performed in the respective comparisons.

Results

Cortisol and dexamethasone impair the TNF-induced death of MCF7 cells

Significant reductions in the total number of cells and the number of cells with a spiculated morphology were observed in the 48 h TNF treatment compared to control cells that received only vehicle (ETOH) treatment. None of these changes were present when TNF was added with CORT or DEX. The addition of GCs resulted in a cytostatic effect; cell density decreased by 76 and 67% with CORT and DEX, respectively, while the occurrence of mitotic figures decreased by 35 and 29% with CORT and DEX, respectively. (Additional file 2). The NCI was measured in real-time every 30 min for 72 h with the xCELLigence™ system (Fig. 1a). MCF7 cells were treated as described above. We analyzed the rate of change and expressed this value as NCI/30 min. The results showed that the control cells (Fig. 1a, red line) increased in three stages: 1° from 3 to 21 h with slope = + 0.0186; 2° from 30 to 44 h with slope = + 0.0375; and 3° from 52 to 72 h with slope = + 0.0432. TNF treatment (Fig. 1a, green line) decreased in three stages: 1° from 14 to 27 h with slope = - 0.0233; 2° from 40 to 50 h with slope = - 0.0208; and 3° from 50 to 72 h with slope = - 0.0062. The combinations of CORT + TNF (Fig. 1a, black line) or DEX + TNF (Fig. 1a, orange line) exhibited two increasing stages followed by one decreasing stage: 1° from 3 to 12 h with slope = + 0.0566; 2° from 10 to 42 h with slope = + 0.0187; and decreasing from 62 to 72 h with slope = - 0.0161. We compared the proliferation rates of the six experimental groups (Fig. 1a, time window m) from 30 to 44 h. The MCF7 control cells grew at a rate of 0.025 NCI/h (100%); however, with the GCs treatments, growth decreased to one-half of the control growth (0.009 (38%) and 0.014 (55%) for CORT and DEX, respectively). With the combined GCs + TNF treatments, the proliferation rates improved (0.016 (65%) and 0.022 (87%) for CORT + TNF and DEX + TNF, respectively). In contrast, TNF treatment alone presented a strong negative growth rate (- 0.01 NCI/h), reflecting cell death ($*p < 0.001$; Fig. 1a and Additional file 3); TNF treatment resulted in the lowest NCI values with respect to the other treatments at 24, 48, and 72 h for the different treatments. In the CORT + TNF combination treatment group, the average NCI values were 2.3, 4.8, and 8 times those in the TNF group at 24, 48, and 72 h, respectively. In the DEX + TNF combination treatment group, the average NCI values were 2.3, 5.4, and 7.6



times those in the TNF group at 24, 48, and 72 h, respectively. The protective effect of both GCs was very similar over time: After 24 h, the NCI values of the CORT + TNF and DEX + TNF groups were 2.3 times that of the TNF group; by 48 h, these NCI values were close to 5 times that of the TNF group; and by 72 h, there was a 7-fold difference. These results suggest that the protective effects of the two GCs tested are very similar (Additional file 3).

Taken together, these results suggest that while TNF induced cell death, the addition of GCs prevented cell death and allowed for cell proliferation up to 45 h. GCs alone appear to exert a cytostatic effect after 48 h. The results demonstrated that both GCs result in similar anti-cytotoxic protection.

The anti-cytotoxic protection conferred by cortisol or dexamethasone is mediated by the glucocorticoid receptor pathway

To analyze whether the protective effect conferred by CORT or DEX is mediated by the binding of the hormone to its receptor, cell viability was evaluated in the presence of the GC antagonist RU486 at 24, 48, and 72 h. Using WB analysis, we verified that the cells

expressed GR, estrogen receptor (ER α), and progesterone receptor (PR β) and that they did not express human epidermal growth factor (HER2), as previously reported for this cell line (Additional file 4) [19, 20]. We observed that in the presence of the antagonist RU486, neither CORT nor DEX inhibited the cytotoxic effect of TNF (Fig. 2a and b, respectively). At 48 h, 50% of the MCF7 cells treated with CORT + TNF were viable, compared with 20% with of cells treated with TNF alone. With CORT + TNF + RU486 treatment, cell viability decreased to 16% (Fig. 2a). Similarly, 50% of the cells treated with DEX + TNF were viable, compared with 19% of cells treated with TNF alone. With DEX + TNF + RU486 treatment, viability decreased to 21% (Fig. 2b). These results suggest that the GR participates in the protective effect mediated by GCs.

Additionally, we wanted to determine whether the CORT- or DEX-induced GR transcription was affected by the TNF treatment. Thus, we measured luciferase activity as a reporter gene placed under the control of an artificial GR promoter by transfecting MCF7 cells with the pcDNA3.1-GR plasmid.

CORT resulted in a 4-fold increase in GR activation, while CORT + TNF resulted in a smaller, 2.8-fold,

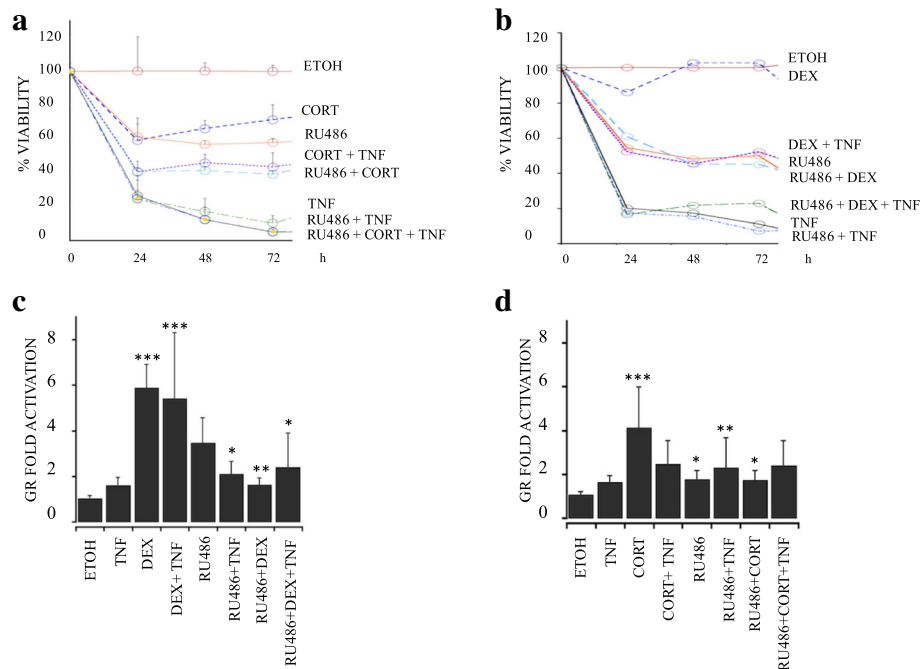


Fig. 2 Protection against cytotoxicity provided by cortisol (CORT) and dexamethasone (DEX) is mediated by the glucocorticoid receptor. **a** Viability courses of MCF7 cells treated for 24, 48, and 72 h with (a) ETOH, TNF, CORT, CORT + TNF, 10 μ M RU486 (RU486), RU486 + TNF, RU486 + CORT, or RU486 + CORT + TNF; $p < 0.005$. **b** Same as in a) except with DEX instead of CORT. The values of all treatment groups were lower than that of the ETOH group; $P < 0.005$. **c** and **d** Luciferase (Luc) activity as an indirect measure of GR-dependent transcription. **c** Treatment with 1 μ M CORT, 1 μ M RU486 and 1 ng/mL TNF for 24 h and analyzed by Luc/ β -Gal; $p < 0.05$. **d** Treatment with 1 μ M DEX instead of CORT; $p < 0.005$. Data are presented as the mean \pm standard deviation (SD); $n = 3$

increase in GR activation (Fig. 2c). On the other hand, DEX promoted up to a 6-fold increase in GR activation, and the combination of DEX + TNF exerted a similar effect of a 5.7-fold increase (Fig. 2d). In contrast, in all treatment groups administered the antagonist, the increase in GR transcription ranged from 1.6-fold (for RU486 treatment) to 2.3-fold (for TNF + RU486 treatment). Taken together, these results indicated that, under experimental conditions in which GCs protect against TNF, the transcription of the GR is not affected. Thus, the GR could participate in the GC-mediated protection.

The presence of cortisol and dexamethasone inhibits PARP1 processing in TNF-treated MCF7 cells and suggests the expression of inhibitor of apoptosis proteins

To establish whether the cytotoxic TNF effect resulted in cell death, we evaluated the cleavage of the enzyme PARP1, a marker of cell damage. We induced the apoptosis of HeLa cells by ultraviolet (UV) light as a positive control. The WB immunoassay (Fig. 3a) showed that in cultures treated with TNF, processed PARP1 was found at only 48 h (Fig. 3a, lane 7). Nevertheless, when TNF was combined with either CORT or DEX, there was no detectable

cleavage of PARP1, suggesting a lack of enzymatic activity. Taken together, these results suggest that GCs interfere with the processing of PARP1.

Cortisol and dexamethasone induced an increase in IAP mRNA levels in MCF7 cells treated with TNF

GC-mediated attenuation of PARP1 cleavage could be due to an up-regulation of IAPs. IAPs inhibit effector caspases that are responsible for PARP1 cleavage. The promoters of c-IAP1 and XIAP have glucocorticoid response elements (GRE), as depicted (Fig. 4a and b). To confirm whether the GC-mediated protection from death activated by TNF-mediated cytotoxicity was associated with the increased expression of IAPs, we analyzed the mRNA content of all members of the mammalian IAP family and of the GR by qRT-PCR. Figure 4c and d show heat maps of the fold increase in mRNA content 18 h after the single or combined treatments (ETOH, TNF, CORT, DEX, or CORT + TNF, DEX + TNF) as determined by qRT-PCR analysis. The data were normalized to the ETOH group. The mRNA expression levels of all IAPs increased in the presence of both GCs. However, the most significant increase was observed in the combined treatment of CORT + TNF, which resulted in the following relative [10^3] order of

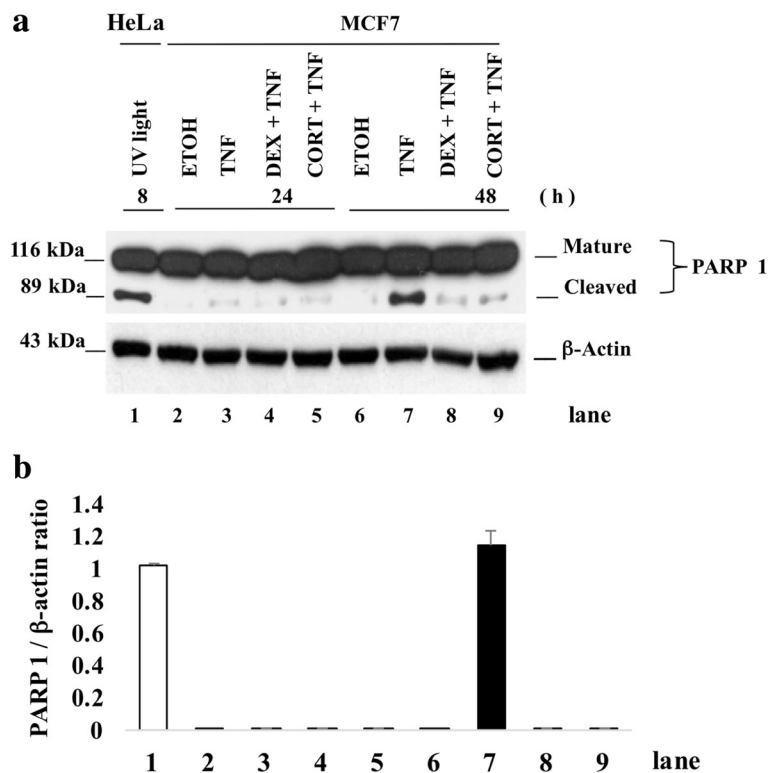


Fig. 3 Death of TNF-treated MCF7 cells correlates with the processing of Poly (ADP-Ribose) Polymerase-1 (PARP1). **a** Western blot immunoassay of 30 µg of total proteins from MCF7 cells treated with ETOH, TNF, CORT + TNF or DEX + TNF for 24 h or 48 h (lanes 2–9). In lane 1, ultraviolet light (UV)-treated HeLa cells were used as a positive control for PARP1 processing; mature PARP1 (116 kDa) and cleaved PARP1 (89 kDa). **b** The cleaved PARP1/β-actin ratios of UV light-treated HeLa cells (lane 1) and of MCF7 cells treated with TNF for 48 h (lane 7) are shown. Data were normalized to the HeLa cell death model and are presented as the mean ± standard deviation (SD); *n* = 3

fold increase: Survivin (539 ± 0.1); c-IAP1 (176 ± 25); NAIP (102 ± 17); Apollon (26 ± 3); XIAP (4 ± 0.6); Ts-IAP (4 ± 0.2); ML-IAP (3 ± 0.4), and c-IAP2 (1 ± 0.1). These results correspond with the effect of GCs; high levels of IAPs, especially c-IAP1 and XIAP, were maintained during protection. We analyzed the mRNA content of the GR with qRT-PCR (Fig. 4c). The CORT + TNF treatment induced a significant [10^3]-fold increase (24 ± 4) in GR mRNA, and treatment with CORT alone had a similar effect. In contrast, DEX alone or in combination with TNF had no effect. Interestingly, TNF alone led to the downregulation of GR transcripts. The combination of DEX + TNF induced a similar expression profile as TNF alone, except for APOLLON, SURVIVIN and NAIP, which displayed significantly decreased expression in the combination treatment. The expression profiles induced by treatment with CORT or DEX alone were similar; the expression of TESTICULAR-IAP, ML-IAP, APOLLON, SURVIVIN and c-IAP1 was increased. However, CORT resulted in the increased expression of XIAP, while DEX had no effect on XIAP. In contrast, CORT

promoted the downregulation of c-IAP2, and DEX induced a mild increase in the expression of c-IAP2. Finally, TNF led to a mild increase in the expression of all IAPs, except for ML-IAP, which was down regulated.

The protective effect of cortisol and dexamethasone maintains the intracellular levels of c-IAP1 and XIAP in TNF-treated MCF7 cells

We wanted to know whether the lack of PARP1 cleavage under the GC + TNF combined treatment was due to the presence of IAPs. After evaluating the protein levels at different times from 3 to 48 h by WB analysis, we observed that, compared with the controls, the cells treated with TNF had decreased c-IAP1 levels (Fig. 5a, upper row; Fig. 5b, gray bars) and XIAP levels (Fig. 5c, upper row; Fig. 5d, gray bars). In contrast, the combined treatment of CORT + TNF led to the sustained expression of c-IAP1 (Fig. 5a, middle row; Fig. 5b, black bars) and XIAP (Fig. 5c, middle row; Fig. 5b, black bars). Similar results were obtained when cells were treated with TNF

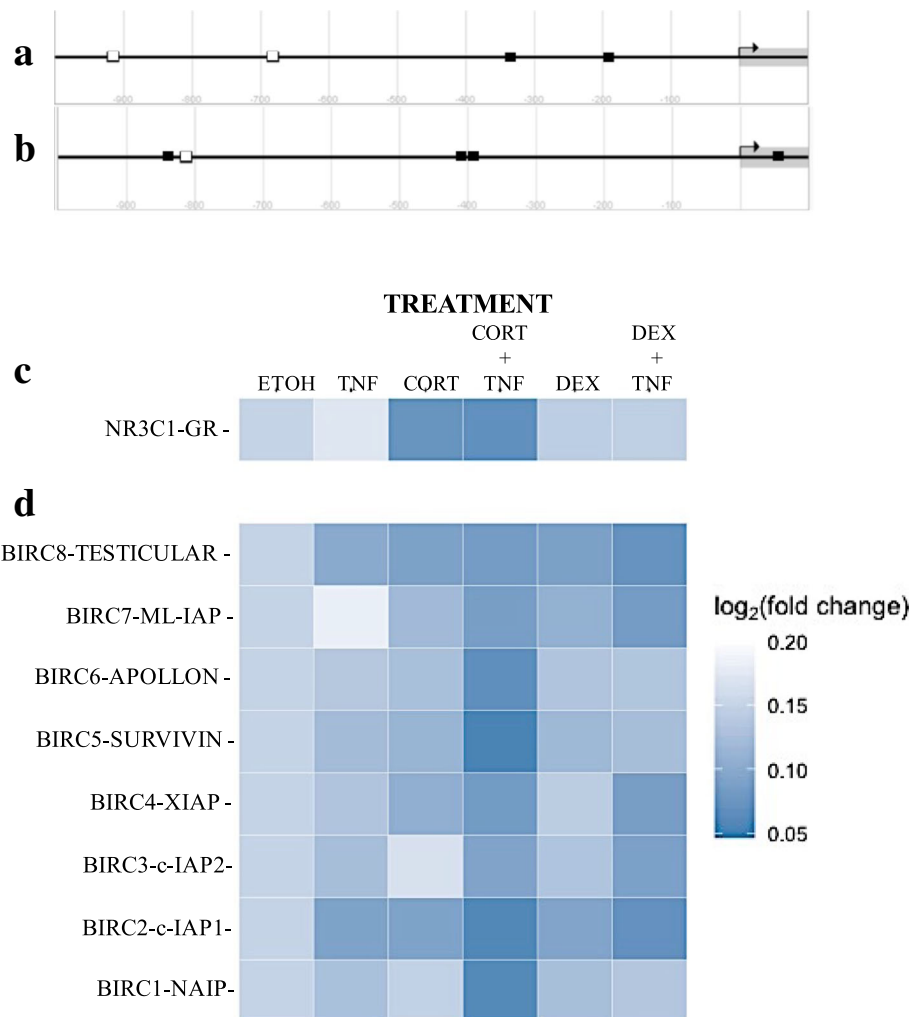


Fig. 4 Diagrams of (a) the gene promoters of *c-IAP1* and (b) *XIAP* and heat maps of the \log_2 (fold change) mRNA levels of the *GR* and the *IAP* gene family. The gene promoters of a) *c-IAP1*, (b) *XIAP* and glucocorticoid receptor (*NR3C1*) response elements (GRE) are shown as white squares (GRE sequence: AGAACANNNTGTTCT). NF- κ B response elements (KBRE sequence: AGTTGAGGGGACTTCCAGG) of the p65 subunit are shown as black squares. The diagrams were modified from those available in the eukaryotic promoter database [51, 52]. **c** Glucocorticoid receptor. **d** The eight members of the mammalian *IAP* family. The data were normalized to ethanol (ETOH)-treated cells. The data represent the fold increase over the control (ETOH \pm standard deviation [SD]); $n =$ three independent experiments

and with the combined treatment DEX + TNF (Fig. 5e and f for *c-IAP1*; Fig. 5g and h for *XIAP*).

In all cases, the combined GC + TNF treatment resulted in a significant difference in the *c-IAP1* and *XIAP* contents. The protein content of both IAPs after 48 h with the combined treatment was not significantly different from to the protein content at 3 h; in all cases, the IAP content at 48 h was higher in cells with the combined treatment than in cells treated with only TNF ($*p < 0.01$). We also compared the protein content at 48 h in the control vs ETOH groups (Additional file 5). These results suggest that GCs either prevent IAP degradation or promote IAP synthesis and could be related to the protection against TNF-mediated cytotoxicity.

siRNAs against *c-IAP1* and *XIAP* inhibited the protection conferred by cortisol or dexamethasone

To verify whether the sustained levels of *c-IAP1* and *XIAP* contribute to the protection conferred by CORT or DEX in TNF-treated MCF7 cells, we interfered with their expression by administering four siRNAs against both the *c-IAP1* and *XIAP* (QIAGEN) genes: *c-IAP1*-siRNA 1, *c-IAP1*-siRNA 2, *c-IAP1*-siRNA 3, and *c-IAP1*-siRNA 4 (Fig. 6a); *XIAP*-siRNA 1, *XIAP*-siRNA 2, *XIAP*-siRNA 3, and *XIAP*-siRNA 4 (Fig. 6b). We selected *c-IAP1*-siRNA 3 and *XIAP*-siRNA 2 for cell transfection, based on their ability to diminishing protein content as observed by the IAP/ β -actin ratio in the WB histogram (Fig. 6a and b). Subsequently,

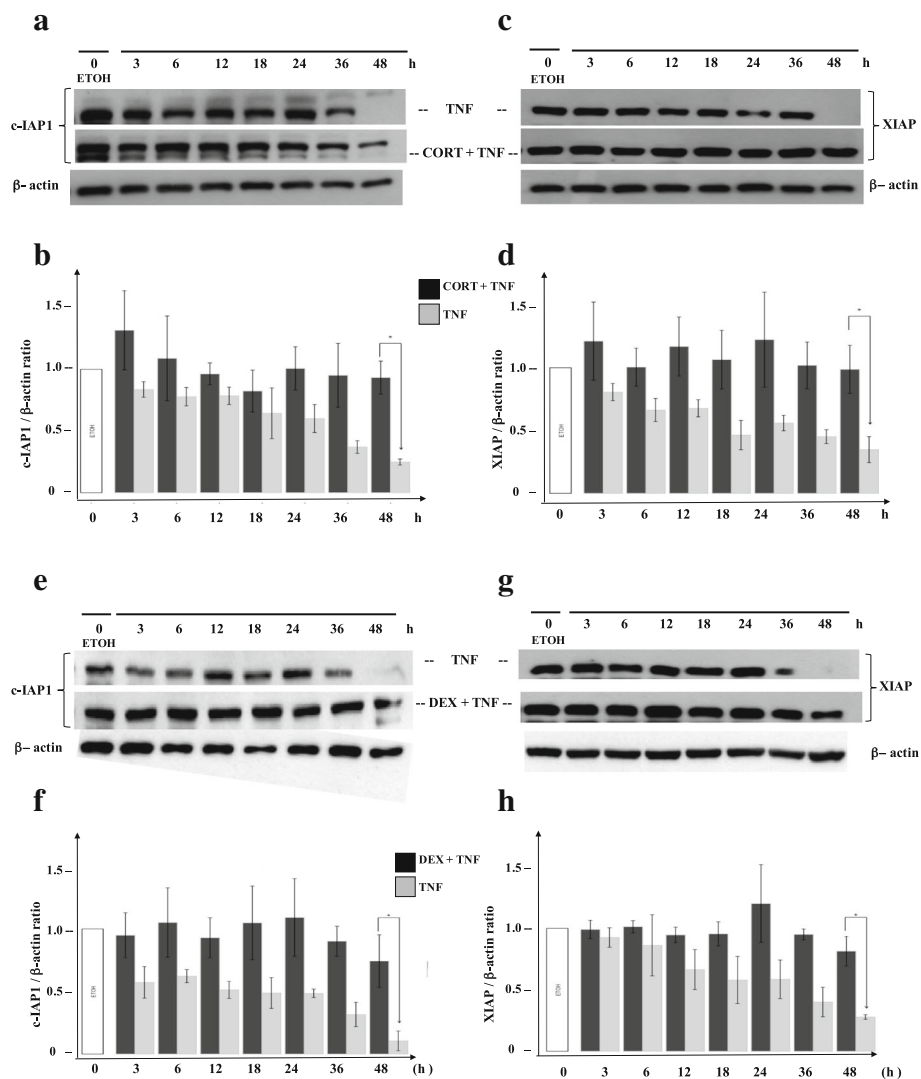


Fig. 5 Cortisol and dexamethasone mediate sustained protein levels of c-IAP1 and XIAP during protection from TNF. Western blot immunoassay detecting c-IAP1 **a** or XIAP **c** using 30 μ g of total proteins from MCF7 cells **a** and **c** treated with ethanol (ETOH), cortisol (CORT), or CORT + TNF for different lengths of time (3, 6, 12, 18, 24, 36, and 48 h). Lane 1 corresponds to cells treated with only vehicle (ETOH) for the indicated time **b** and **d**. Histograms representing panel **a** and panel **c** with the ratios of normalized c-IAP1 (panel **a**) and XIAP (panel **c**) levels to the β -actin signal (relative density [RD]) in cells treated with CORT. Vertical lines indicate the standard deviation (SD) of the mean ($*p < 0.005$). Data are presented as the mean \pm SD; $n = 3$. Panels **e** and **g** are the same as **a** and **c** but with DEX instead of CORT. Panels **f** and **g** are the same as **b** and **d**, but with DEX instead of CORT. ($*p < 0.005$). Data are presented as the mean \pm SD; $n = 3$

we transfected MCF7 cells as described in the experimental procedures with the chosen siRNAs. Then, 24 h post-transfection, the cells were treated with ETOH, TNF, CORT + TNF or DEX + TNF to evaluate the importance of *IAP* expression in the protection conferred by GCs. Cell viability was evaluated 18 h post-treatment. Interference with *IAP* expression significantly decreased ($*p < 0.05$) the anti-cytotoxic effects of CORT and DEX (Fig. 6c and Additional file 6). The protection conferred by CORT + TNF decreased by 18.6% with c-IAP1 knockdown and by 21.6% with XIAP knockdown, while the protection conferred by

DEX + TNF decreased by 22.5% with c-IAP1 knockdown and by 28.2% with XIAP knockdown (Additional file 6).

With both GCs, these decreases were statistically significant ($p < 0.05$) and demonstrated that the presence of these two IAPs is important for anti-cytotoxic protection.

Discussion

GCs are steroid hormones responsible for modulating basic metabolism, cell survival, and homeostasis, as well as for regulating immune and neural functions

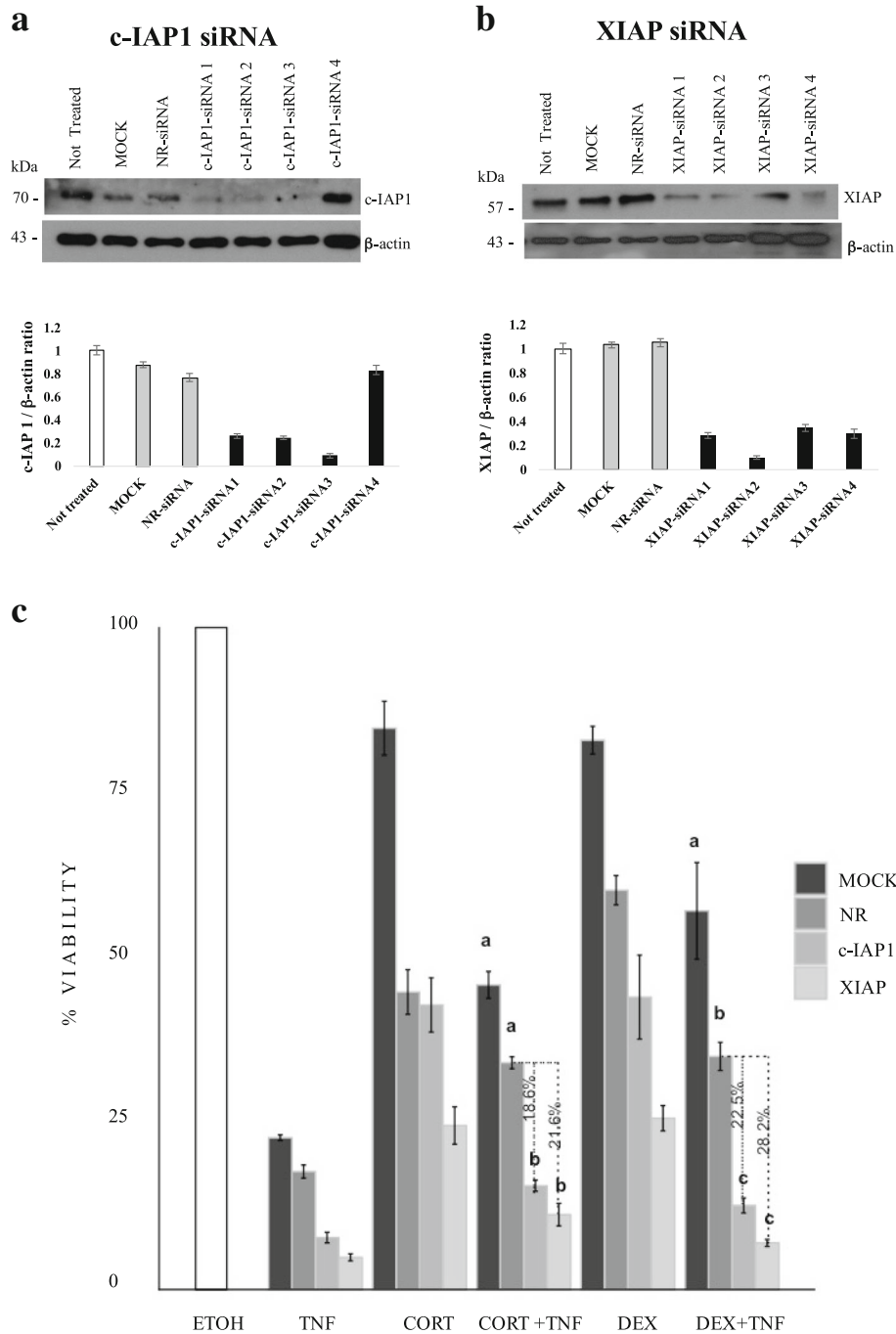


Fig. 6 GC-mediated protection against TNF is diminished by inhibiting c-IAP1 or XIAP expression. Western blot immunoassay of MCF7 cells transfected with the four siRNAs against c-IAP1 (a) or XIAP (b) for 18 h. MOCK: no siRNA; NR-siRNA: nonrelated siRNA; c-IAP1-siRNA and XIAP-siRNA, from 1 through 4 (with four different sequences each). The histograms present the ratios of normalized siRNA-targeted c-IAP1 and XIAP expression to normalized β -actin expression. For transfections, we used the lowest IAP/ β -actin ratio. Vertical lines indicate the standard deviation of the mean ($*p < 0.005$). Data are presented as the mean \pm standard deviation [SD]; $n = 3$. c) Viability assay of MCF7 cells treated for 24 h with the indicated treatments. An average of two independent experiments was performed with each sample conducted in sextuplicate. Vertical lines represent the standard deviation of the mean; $*p < 0.05$. Letters indicate distinct groups based on the post hoc statistical comparison ($p < 0.05$). If groups share at least one letter, they do not statistically differ. Data are presented as the mean \pm SD; $n = 2$

[21]. CORT is the best known adrenal steroid and is more potent than corticosterone, while synthetic agonists such as DEX are even more potent than CORT [22]. CORT biosynthesis occurs in the fasciculate layer of the adrenal gland; it has a short half-life of approximately 90 min, and the expression of CORT has a circadian rhythm [23, 24]. The effect of GCs on vital functions is frequently used in clinical settings to strengthen weak or terminal patients. All of these effects are mediated by the transcriptional activation of GR target genes [25–27].

In contrast, the role of GCs in cancer is currently being established. IHC experiments have demonstrated that the GR localized in the nucleus of tumor biopsies from different tissues of origin [28]. Regarding breast cancer, the mRNA of the GR gene (*NR3C1*) is abundantly present in patient tumor biopsies of all intrinsic subtypes (Fig. 7a). Although we did not examine GR protein expression levels, it has been reported that ER/PR-positive and low-grade tumors express high levels of GR [29]. Moreover, only 3% of the 721 patient samples in our analysis had a mutation in *NR3C1* (data not shown). This finding suggests that GR expression in tumoral cells and in nontransformed cells associated with tumors contributes to the biological function of breast cancer, and a detailed analysis of GC signaling could

reveal genes that drive breast cancer and identify therapeutic targets [30]. Although the frequency of each subtype in the database consulted in this study overrepresents the luminal A subtype (61%) and underrepresents the HER2 subtype (5%), the database generally coincides with the reported population prevalence [31]. It is important to recognize that gene expression in tumor samples, such as those described in Fig. 7, does not imply that GR expression is restricted to tumor cells; the GR could be expressed in nontransformed tumor-associated cell types (endothelial cells, fibroblasts, or immune cells). In addition, GR expression has been reported in nontransformed cells associated with luminal A cells in human breast cancer, such as cancer-associated fibroblasts (CAFs) positive for smooth muscle actin (SMA), which present a myofibroblast (PMY) phenotype. The expression of GR in breast CAFs could be an interesting target for future therapy to regulate the tumoral breast microenvironment [32]. It should be noted that we used RNA-seq expression data rather than proteomic information and that the database was limited to 77 patients. The protein product of *NR3C1* possesses a biological function. It is possible that transcriptomic and proteomic data do not correlate and that our conclusions may not be valid.

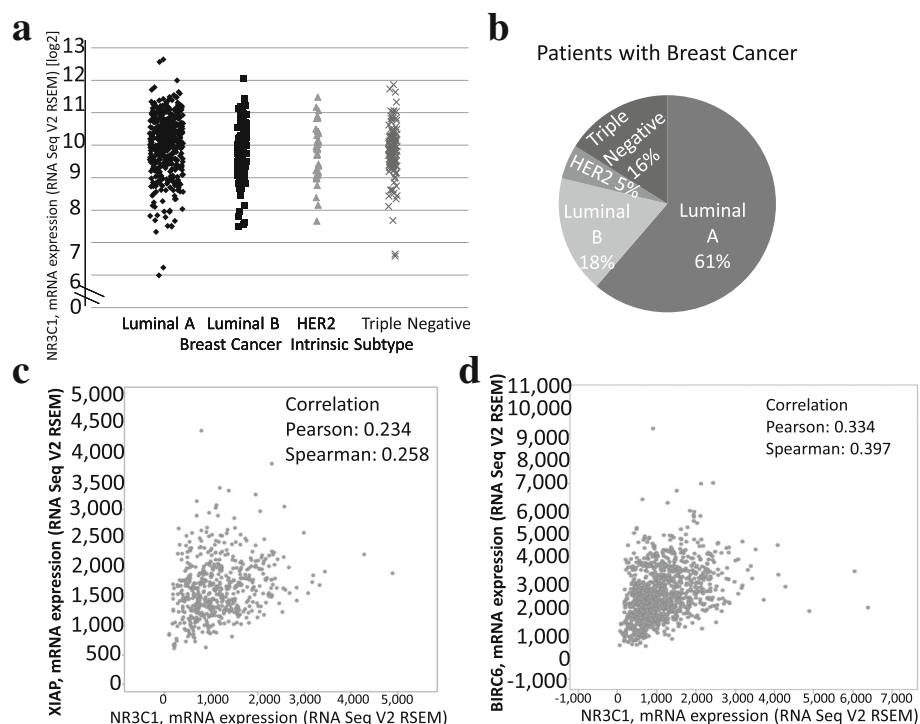


Fig. 7 *NR3C1* mRNA expression and coexpression with other genes in samples from breast cancer patients. **a** *NR3C1* mRNA expression in 721 samples from patients with different intrinsic subtypes of breast cancer. The ranges of *ESR1* and *AR* expression are included for comparison and indicated by brackets. **b** Percentage of patients expressing each intrinsic subtype of breast cancer in panel **a**. **c** and **d** Coexpression of *NR3C1* mRNA with *XIAP* or *BIRC6* mRNA in the data of 1100 tumor samples from breast cancer patients

Our in vitro results indicate that the combined treatment of CORT + TNF induces the expression of all members of the IAP family (Survivin>c-IAP1 >NAIP>Apollon>XIAP >ML-IAP > Ts-IAP > c-IAP2), and analysis of the TCGA database reveals a different order of correlation between GR and IAP family members, except for Survivin, which exhibits a negative correlation (Apollon, XIAP, NAIP, c-IAP1 >ML-IAP, Ts-IAP) (Fig. 7c and d; Table 1). It is interesting that we identified a positive correlation between GR and IAP family members both in vitro and in vivo in the RNA-seq data; this result could be related to the cytoprotective effect of the IAP family. While it is clear in vitro that IAP expression is dependent on simultaneous stimulation with CORT + TNF, in vivo we can refer to only the positive correlation of the expression of the GR and the IAP family. The discrepancies in the relative order of the expression of the GR and IAP family members in vitro and in vivo could be due to the complexity of in vivo signals (hormones, metabolic changes, and tumor microenvironment). However, the coexpression of *GR* and *IAP* genes may not indicate the direct and exclusive induction of the latter by the former. Other transcription factors could be required for IAP induction. It has yet to be determined whether the GR binds to the promoters of IAP family members. Even if a direct interaction does exist, the level that this modulation of gene expression occurs has yet to be described (i.e., whether the GR modulates the transcription, translation, mRNA half-life or protein degradation of IAPs).

The data used to produce this table were obtained from tumor samples of breast cancer patients and were procured from the Breast Invasive Carcinoma (TCGA, Provisional) database in cBioportal. In our in vitro experiments, we found that TNF-mediated cytotoxicity is inhibited by GCs (CORT or DEX) in MCF7 breast cancer cells. This protective effect is dependent on the expression of IAP family members (c-IAP1 and XIAP). A key issue arising from these results is whether GCs induce an increase in cell proliferation, inhibit cell death,

or both to counteract TNF cytotoxicity. GCs have been reported to be able to arrest the cell proliferation of MCF7 cells [33]. In our results, GC treatments alone reduced cell proliferation (Additional file 2). When GCs were combined with TNF, cell proliferation rates increased by 27 and 32% for CORT and DEX, respectively (Fig. 1a). These improvements in the cell proliferation rate with the combined treatments suggests that the decrease in cell proliferation induced by GCs is not directly involved in the protective effect. We postulate that additional mechanisms related to the transcriptional activity of GCs could be related to cell survival, such as anti-apoptotic mediators; in fact, GCs have been reported to induce IAP expression [34]. This dual effect has also been reported in other studies, and the effect on tumors has been controversial; GCs have been described as both promoters and inhibitors of tumor proliferation [35]. Some clinical studies have reported that GCs can suppress tumor progression and metastasis, especially in endocrine responsive tumors [36]. In contrast, other clinical studies reported that GCs in ER-negative tumors are associated with chemo-resistance and worsened prognosis [37]. This controversial effect might be a result of various factors, including different levels of GR expression, which could be used as a prognostic biomarker in lower grade, ER-positive luminal breast cancer. Moreover, GCs effect could be influenced by tumor size, stage and grade [3], GC doses, response to endocrine therapy and inflammatory signaling, such as an interaction with TNF as shown in our results. These differences are of clinical relevance since synthetic GCs, particularly DEX, are routinely included in chemotherapy therapies for breast cancer and other nonhematologic malignancies to reduce side effects, such as nausea, anorexia and hypersensitivity [6]. However, RU486 is not used in the clinic for breast cancer treatment, and it was used in this study for its inhibitory effect on GR [25].

We used RU486, a partial antagonist of GR, to probe whether GC-mediated protection requires interaction with the GR (Fig. 2a and b). The fact that the GC-mediated protection against TNF treatment was diminished in the presence of RU486 suggests that the GR is required for this protection. The use of RU486 as a specific antagonist is limited by the fact that when used alone, it can act as a partial agonist (Fig. 2c and d) [38]. Therefore, to provide further support for the involvement of the GR-IAP pathway, we utilized siRNA against c-IAP1 and XIAP (Fig. 6).

There are several molecular markers to detect caspase-dependent cell death. PARP1 is a direct substrate of the effector caspases 3, 6 & 7; thus, PARP1 cleavage is a good indicator of caspase proteolytic activity. Phosphatidyl serine translocation from the

Table 1 Pearson correlation coefficient of the coexpression of *NR3C1* vs IAP family genes

Gene coexpressed with <i>NR3C1</i>	Pearson correlation (<i>R</i>)
<i>Apollon</i>	0.344
<i>XIAP</i>	0.234
<i>BIRC3 (c-IAP2)</i>	0.210
<i>NAIP</i>	0.210
<i>BIRC2 (c-IAP1)</i>	0.141
<i>BIRC7 (ML-IAP)</i>	0.025
<i>BIRC8 (Ts-IAP)</i>	-0.002
<i>BIRC5 (Survivin)</i>	-0.249

cytoplasmic lamella to the extracellular membrane lamella is also a frequently used marker of apoptosis, but it is not directly linked to caspase activation. Caspase activation leads to DNA fragmentation and inhibits DNA repair pathways such as the pathway that requires PARP1 [39]. In MCF7 cells, TNF treatment has been documented to promote the processing of PARP1 [16]. A key observation included the modest processing of PARP1 in cells treated with GCs + TNF (Fig. 3a, lanes 8 and 9) compared with cells treated with only TNF (Fig. 3a, lane 7). These results could imply that the proteases involved in PARP1 cleavage were inhibited, most likely by IAPs.

Apoptosis is a programmed cell death mechanism that requires the activation of a family of cysteine proteases [40]. In MCF7 cells, TNF induces the activation of these proteases, leading to the processing of the 116 kDa PARP1 (poly [ADP-ribose] polymerase-1) into the 89 kDa form. The MCF7 cell line is the only breast cancer cell line reported to have a cytotoxic response to TNF [14–16]. We suggested the involvement of IAPs and determined whether this protection is associated with the inhibition of PARP1 processing.

It is interesting to note that GCs alone induced an increase in the mRNA levels of some IAPs (Testicular-IAP, ML-IAP, Survivin and c-IAP1). TNF alone had a selective effect, inducing only Testicular-IAP and c-IAP1 and exerting a mild effect on other IAPs. However, the combination of DEX + TNF appears to have an additive effect. In contrast, the combination of CORT + TNF appears to have a synergistic effect on IAP expression levels, especially for Survivin and NAIP.

The relative increase in the expression of XIAP and c-IAP1 was also evaluated by WB analysis. However, the protein level of these IAPs was not as exacerbated as their mRNA levels. A possible explanation for this could be post-transcriptional regulatory effects such as mRNA stability, selection of mRNA transcripts for translation and high turn-over of the proteins after translation. Interestingly Nestal de Moraes et al., showed that doxorubicin treatment in MCF7 cells resulted in poorly correlated effects on the mRNA and protein levels of Survivin and XIAP [41]. Moreover, Chunsen Xu et al., reported that the mRNA and protein levels of survivin do not correlate in breast cancer tumor tissues, but the mRNA levels are a predictor of poor prognosis in patients with breast cancer [42].

TNF treatment induced a decrease in IAP protein levels (Fig. 5a, c, e and g, upper row), and cells treated with GCs + TNF maintained their IAP protein levels (Fig. 5a, c, e and g, middle row). This effect could result from interference with IAP degradation, increased IAP transcription, or a combination of both. IAPs act as competitive inhibitors of apoptosis, resulting in the

delay or the complete prevention of cell death. IAPs interact with caspases through the baculovirus inhibitor of apoptosis protein repeat domain (BIR) domain and control the assembly of the “riposome”. Specifically, c-IAP1 and XIAP have three BIR domains that selectively interact with caspases to control cell death [43]. Homeostasis is regulated by maintaining the equilibrium between the synthesis and degradation of proteins and is mediated by poly-ubiquitination and proteasome degradation [39]. We measured the processing of PARP1 substrate (Fig. 3, lane 7). The addition of CORT or DEX to TNF treatment prevented PARP1 cleavage (Fig. 3, lanes 8 and 9). We postulated that this interference could be explained if GCs induced the expression of IAPs [34]. The promoters of c-IAP1 (Fig. 4a) and XIAP (Fig. 4b) contain canonical GC response elements (GRE) (Fig. 4a and b, white squares), which could induce their expression in the presence of CORT and DEX.

Additionally, these promoters also contain NF- κ B-response elements (KBRE) (Fig. 4, black squares). It is noteworthy that it was previously reported that TNF treatment activates NF- κ B and that the protection provided by DEX against TNF is dependent on NF- κ B activation in MCF7 cells [16]. Additionally, this protection was reported in mouse fibroblasts L929 cells [44].

The transient expression of siRNA targeting c-IAP1 and XIAP led to a significant decrease in protein content (Fig. 6a and b) and was sufficient to interfere with the protection conferred by CORT and DEX. It is interesting to note that interfering with XIAP resulted in a stronger effect than interfering with c-IAP1 (Fig. 6c). Considering that the GC-induced protection against TNF-mediated cytotoxicity was correlated with a sustained level of IAPs, it is likely that this protection is the result of a combined effect of at least these two IAPs. This result provides support for the original observation by Messmer [15] that DEX protects against TNF-mediated cytotoxicity while sustaining IAP proteins content. Similar results have been reported for DEX in A549 cells; DEX protected against TRAIL and anticancer drugs through mediating c-IAP2 expression [45]. In vivo, DEX has been reported to interfere with apoptosis in the central nervous system and in testicular germ cells [46]. It is likely that, under these in vitro and in vivo conditions, the expression of diverse forms of IAPs (c-IAP1 and XIAP) provides protection against apoptosis. However, whether the anti-apoptotic effect of GCs occurs in a more clinically relevant setting, such as cancer drug-mediated cytotoxicity, is an intense area of debate [7]. GCs are the most common antiemetics and are administered shortly before chemotherapy to counteract the secondary effects of chemotherapy [6]. In the case of MCF7 cells that represent luminal A breast cancer, in vitro evidence suggests that GCs inhibit the effect of

paclitaxel [47]. Nevertheless, GCs alone have anticancer effects, such as inhibiting angiogenesis in vitro [48] and cell proliferation [49]; the latter effect was recently associated with the capacity of cells to re-establish the expression of clock genes such as *BMAL* [50], although this has yet to be proven in the case of breast cancer cells. Moreover, studies in humans that evaluated the effect of GCs on chemotherapy effectiveness in breast cancer patients, to the best of our knowledge, have not yet been carried out. The time of chemotherapy administration could also be relevant for its effectiveness, considering the circadian nature of the serum levels of CORT [23].

ER+ breast cancer represents more than 60% of all breast cancer patients; however, this clinical group is heterogeneous. Considering our findings and those of other studies that support a relevant role of the GR in this type of cancer, it would be useful to revisit the relevance of the expression profile of nuclear receptors (AR, MR, VDR, TDR, etc.), coactivators, corepressors

and isoforms. This kind of analysis could lead to the identification of subgroups and the detection of differences in the prognosis and treatment response of these patients.

Conclusions

Hormone therapy in breast cancer is limited to the inhibition of estrogen signaling. Cumulative evidence indicates a role for endogenous and exogenous GCs in tumor progression. Here, we underscore the role of IAPs in the mechanism by which CORT and DEX interfere with the TNF-mediated cytotoxic effect on MCF7 breast cancer cells (Fig. 8). We also show that IAPs correlate with GR expression using public transcriptomic data from the tumors of patients. Our study should motivate further analysis on the administration of GCs or anti-GCs to breast cancer patients. Additionally, the gene expression levels of members of the *GR* and *IAP* families could be evaluated as prognostic markers for breast cancer therapy.

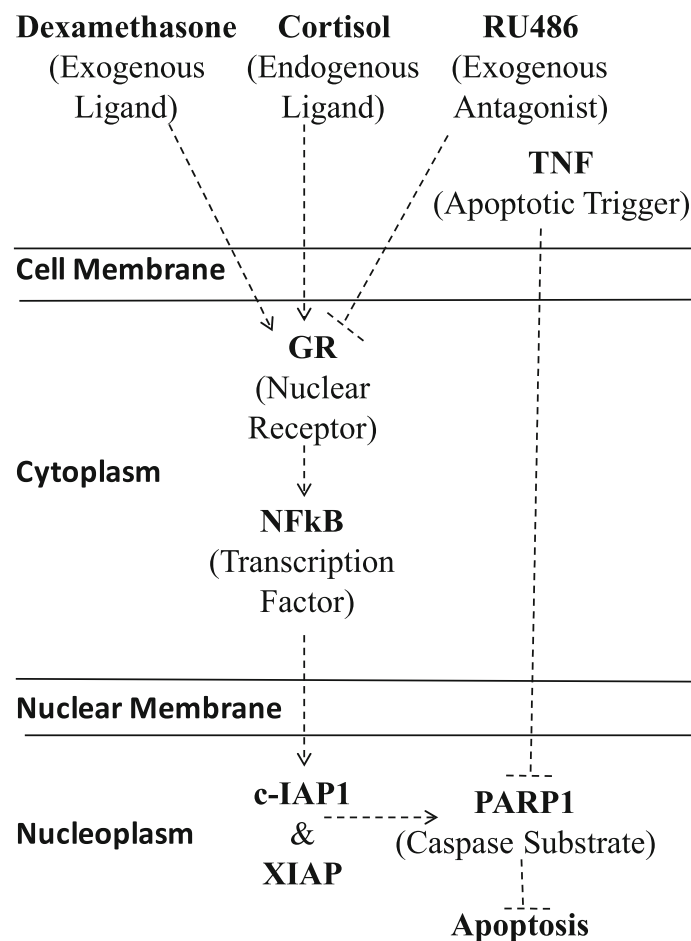


Fig. 8 Mechanistic map of the effect of TNF and GCs on MCF7 cells. Glucocorticoid receptor (GR), mifepristone (RU486), poly-adenyl ribosyl polymerase-1 (PARP1), nuclear factor-kappa light chain in B cells (NF-kB), cellular 1 inhibitor apoptosis protein (c-IAP1), X chromosome-linked inhibitor apoptosis protein (XIAP), and tumor necrosis factor (TNF)

Additional files

Additional file 1: Sequences of the oligonucleotide primers used in qRT-PCR. List of 22 oligonucleotides, primer sequences, position, melting temperature (T_m), and PCR product size used for qRT-PCR in the project. (DOCX 97 kb)

Additional file 2: The addition of glucocorticoids exerts changes in the proliferation of MCF7 cells. Micrograph of the confluent culture of MCF7 tumor cells treated for 48 h with 0.1% ethanol (ETOH), 10 μM cortisol (CORT), and 10 μM dexamethasone (DEX). Arrows show mitotic figures. Representative images were taken under X100 magnification. (DOCX 14283 kb)

Additional file 3: Dexamethasone and cortisol block the cytotoxic effect of TNF on MCF7 cells. Histogram of NCI at 24, 48, and 72 h, obtained from the XCELLigence system. Vertical bars represent the SD of each measurement, and asterisks represent significant differences between treatments (**p* < 0.001). Data are presented as the mean ± SD. *n* = 3. (DOCX 279 kb)

Additional file 4: Western blot immunoassay for the detection of nuclear receptors in MCF7 and BT-474 breast cancer cells. Total protein extracts (30 μg) from MCF7 or BT-474 cells. Arrows show the expected molecular weight for each of the analyzed receptors (HER2/neu, human epidermal growth factor receptor type 2; GR, glucocorticoid receptor; PR, progesterone receptor; ER, estrogen receptor). (DOCX 498 kb)

Additional file 5: Cortisol and dexamethasone mediate sustained protein levels of c-IAP1 and XIAP during protection against TNF. The control and vehicle (ETOH) panel from Fig. 5a, c, e and g at 0 h and 48 h of ETOH, GCs and TNF treatment. (DOCX 431 kb)

Additional file 6 siRNA against c-IAP1 or XIAP decreased the cytotoxic protection of GCs. Values represent the % viability at 18 h post-treatment. MOCK: Transfection without siRNA. NR-siRNA: Transfection with non-related siRNA. c-IAP1-siRNA: Transitory transfection with siRNA targeting c-IAP1 transcripts. XIAP-siRNA: Transitory transfection with siRNA targeting c-XIAP transcripts. The siRNAs selected for this experiment resulted in the lowest expression of their target IAP (as shown in Fig. 6) (*): Represents the % loss of protection in cells with siRNA-mediated inhibited c-IAP1 and XIAP vs cells treated with CORT + TNF + NR-siRNA or DEX + TNF + NR-siRNA. (DOCX 130 kb)

Abbreviations

BIR: Baculovirus inhibitor of apoptosis protein repeat domain; c-IAP1: cellular inhibitor of apoptosis protein 1; CORT: Cortisol; DEX: Dexamethasone; DUSP1: Dual specificity phosphatase 1; ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay; ERα: Estrogen receptor alpha; ETOH: Ethanol; FAS: First apoptosis signal receptor; FBS: Fetal bovine serum; GCs: Glucocorticoids; GR: Glucocorticoid receptor alpha; GRE: Glucocorticoid response elements; HER2: Human epidermal growth factor receptor 2; IAP: Inhibitor of apoptosis proteins; IHC: Immunohistochemistry; MCF7: Michigan cancer foundation 7 cell line; NCI: Normalized cell index; NF-κB: Nuclear factor-kappa B; NR3C1: Glucocorticoid receptor gene; PARP1: Poly (ADP-ribose) polymerase-1; PRβ: Progesterone receptor beta; RNAi: RNA interference; RPMI: Roswell Park Memorial Institute; RU486: Mifepristone; SGK1: Serum/glucocorticoid regulated kinase 1; siRNA: Short interfering RNA; TCGA: The Cancer Genome Atlas; TNBC: Triple negative breast cancer; TNF: Tumor necrosis factor; XIAP: X-linked inhibitor of apoptosis protein

Acknowledgments

We would like to thank Dr. Vilma Maldonado-Lagunas (INMEGEN) for her continuous support and advice, as member of the tutoring committee throughout the doctoral thesis of Irma B. Mitre-Aguilar. We would also like to acknowledge Dr. Felipe Vilchis-Urbe (INCMNSZ) and Dr. Ignacio Camacho-Arroyo (FQ-UNAM) for kindly donating the CORT and the RU486, respectively, for this study. This paper constitutes a partial fulfillment of IBM-A to obtain her PhD "Doctor en Ciencias del posgrado en Ciencias Biológicas", Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). IBM-A acknowledges her graduate program "Posgrado en Ciencias Biológicas" the academic support through the admission, semestral evaluations and graduation program.

Funding

This study was funded by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) with a Basic Science Grant 2015 (grant number 256725) and a graduate PhD student scholarship (grant number 172558). Also this study was funded by the Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación en Innovación Tecnológica (PAPIIT), DGAPA-UNAM with grant number IV200218. The funding agencies were not involved in the study design, data acquisition, interpretation of the results or writing of the manuscript.

Availability of data and materials

The raw data generated for this article are available from the corresponding author upon reasonable request.

Authors' contributions

IBM-A had the primary role in the design and execution of the majority of the experiments in this study and in writing the manuscript. TBG supervised and analyzed data in the siRNA and gene reporter assays. VMR-L performed the qRT-PCR experiments and performed the primary analysis. AJCQ performed the real-time cell viability experiments and contributed to the corresponding sections of the manuscript; he was also entirely responsible for the bioinformatic analysis. NRMD performed the statistical analysis and prepared some figures. JLVG contributed to the WB of PARP1 and supervised the overall operation of the tissue culture facilities. DMM contributed to the cell viability assays and to the generation and selection of micrographs. AAG contributed by performing a WB experiment and documenting the expression profile of GR, ER, PR & HER2 in the MCF7 cell line. JMR and AREG provided critical reviews of the manuscript and the overall scope of the project. YCG wrote the sections describing the role of GR, DEX and RU486 in breast cancer patients in the clinical setting. ALR supervised and provided the facilities and reagents for the gene reporter assay and siRNAs as well as critically participated in the interpretation and analysis of the corresponding data. AZD conceived and designed this study, supervised the interpretation and analysis of the experiments presented as well as directed and supervised the preparation of the manuscript. All of the authors have read and agreed with the final version of the manuscript.

Ethics approval and consent to participate

Not applicable.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Author details

¹Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIBO), Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), 04510 Ciudad de México (CDMX), México, México.
²Programa de Investigación en Cáncer de Mama, IIBO, UNAM, 04510 México, CDMX, México.
³Unidad de Bioquímica, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubiran (INCMNSZ), 14080 México, CDMX, México.
⁴Centro de Cáncer, Centro Médico ABC, 01120 México, CDMX, México.
⁵Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, IIBO, UNAM, 04510 México, CDMX, México.
⁶Departamento de Biología Molecular, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER), 14080 México, CDMX, México.
⁷Red de Apoyo a la Investigación-Coordinación de la Investigación Científica (RAI-CIC), UNAM, 14080 México, CDMX, México.
⁸Departamento de Hemato-Oncología, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubiran, 14080 México, CDMX, México.

Received: 9 July 2018 Accepted: 31 March 2019

Published online: 15 April 2019

References

- Mueller C, Haymond A, Davis JB, Williams A, Espina V. Protein biomarkers for subtyping breast cancer and implications for future research. *Expert Rev Proteomics*. 2018;15:131–52.
- Louie MC, Sevigny MB. Steroid hormone receptors as prognostic markers in breast cancer. *Am J Cancer Res*. 2017;7:1617–36.
- Abduljabbar R, Negm OH, Lai C-F, Jerjees DA, Al-Kaabi M, Hamed MR, Tighe PJ, Buluwela L, Mukherjee A, Green AR, Ali S, Rakha EA, Ellis IO. Clinical and biological significance of glucocorticoid receptor (GR) expression in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2015;150:335–46.
- Van Cauter E, Leproult R, Kupfer DJ. Effects of gender and age on the levels and circadian rhythmicity of plasma cortisol. *J Clin Endocrinol Metab*. 1996;81:2468–73.
- Eismann EA, Lush E, Sephton SE. Circadian effects in cancer-relevant psychoneuroendocrine and immune pathways. *Psychoneuroendocrinology*. 2010;35:963–76.
- Ettinger DS, Berger MJ, Aston J, Barbour S, Bergsbaken J, Brandt D, Crews JR, Jeong-Kim E, Kirkegaard S, Kloth DD, Klute K. Antimetastasis. In: *Natl Compr Cancer Netw Guidelines*. 2018. https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/default.aspx#antimetastasis. Accessed 11 Apr 2018.
- Maurice-Dror C, Perets R, Bar-Sela G. Glucocorticoids as an adjunct to oncologic treatment in solid malignancies – not an innocent bystander. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2018;126:37–44.
- Volden PA, Conzen SD. The influence of glucocorticoid signaling on tumor progression. *Brain Behav Immun*. 2013;30:S26–31.
- Buxant F, Kindt N, Laurent G, Noël J-C, Saussez S. Antiproliferative effect of dexamethasone in the MCF-7 breast cancer cell line. *Mol Med Rep*. 2015;12:4051–4.
- Crozier M, Porter LA. Paclitaxel-induced transcriptional regulation of Fas signaling pathway is antagonized by dexamethasone. *Breast Cancer Res Treat*. 2015;154:33–44.
- Zhang C, Beckermann B, Kallifatidis G, Liu Z, Rittgen W, Edler L, Büchler P, Debatin K-M, Büchler MW, Friess H, Herr I. Corticosteroids induce chemotherapy resistance in the majority of tumour cells from bone, brain, breast, cervix, melanoma and neuroblastoma. *Int J Oncol*. 2006;29:1295–301.
- Mikosz CA, Brickley DR, Sharkey MS, Moran TW, Conzen SD. Glucocorticoid receptor-mediated protection from apoptosis is associated with induction of the serine/threonine survival kinase gene, *sgk-1*. *J Biol Chem*. 2001;276:16649–54.
- Wu W, Chaudhuri S, Brickley DR, Pang D, Karrison T, Conzen SD. Microarray analysis reveals glucocorticoid-regulated survival genes that are associated with inhibition of apoptosis in breast epithelial cells. *Cancer Res*. 2004;64:1757–64.
- Cai Z, Capoulade C, Moyret-Lalle C, Amor-Gueret M, Feunteun J, Larsen A, Paillerets BB, Chouaib S. Resistance of MCF7 human breast carcinoma cells to TNF-induced cell death is associated with loss of p53 function. *Oncogene*. 1997;15:2817–26.
- Messmer UK, Pereda-Fernandez C, Manderscheid M, Pfeilschifter J. Dexamethasone inhibits TNF-alpha-induced apoptosis and IAP protein downregulation in MCF-7 cells. *Br J Pharmacol*. 2001;133:467–76.
- Machuca C, Mendoza-Milla C, Córdova E, Mejía S, Covarrubias L, Ventura J, Zentella A. Dexamethasone protection from TNF-alpha-induced cell death in MCF-7 cells requires NF-kappaB and is independent from AKT. *BMC Cell Biol*. 2006;7:9.
- Cerami E, Gao J, Dogrusoz U, Gross BE, Sumer SO, Aksoy BA, Jacobsen A, Byrne CJ, Heuer ML, Larsson E, Antipin Y, Reva B, Goldberg AP, Sander C, Schultz N. The cBio Cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discov*. 2012;2:401–4.
- Gao J, Aksoy BA, Dogrusoz U, Dresdner G, Gross B, Sumer SO, Sun Y, Jacobsen A, Sinha R, Larsson E, Cerami E, Sander C, Schultz N. Integrative analysis of complex Cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Sci Signal* 2013; 6:p1–p11.
- Barrios-García T, Gómez-Romero V, Tecalco-Cruz Á, Valadéz-Graham V, León-Del-Río A. Nuclear tristetraprolin acts as a corepressor of multiple steroid nuclear receptors in breast cancer cells. *Mol Genet Metab Reports*. 2016;7:20–6.
- Jarman EJ, Ward C, Turnbull AK, Martínez-Pérez C, Meehan J, Xintaropoulou C, Sims AH, Langdon SP. HER2 regulates HIF-2α and drives an increased hypoxic response in breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2019;21.
- Hardy RS, Raza K, Cooper MS. Endogenous glucocorticoids in inflammation: contributions of systemic and local responses. *Swiss Med Wkly*. 2012;142:1–10.
- Hall JE. Guyton and Hall textbook of medical physiology twelfth edition. Twelfth. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2011.
- Ota T, Fustin JM, Yamada H, Doi M, Okamura H. Circadian clock signals in the adrenal cortex. *Mol Cell Endocrinol*. 2012;349:30–7.
- Hyatt PJ, Bhatt K, Tait JF. Steroid biosynthesis by zona fasciculata and zona reticularis cells purified from the mammalian adrenal cortex. *J Steroid Biochem*. 1983;19:953–9.
- Raux-Demay MC, Pierret T, D'Yvoire MB, Bertagna X, Girard F. Transient inhibition of RU 486 antiglucocorticoid action by dexamethasone. *J Clin Endocrinol Metab*. 1990;70:230–3.
- Ambrogio AG, Cavagnini F. Role of “old” pharmacological agents in the treatment of Cushing’s syndrome. *J Endocrinol Investig*. 2016;39:957–65.
- So AYL, Chaivorapol C, Bolton EC, Li H, Yamamoto KR. Determinants of cell- and gene-specific transcriptional regulation by the glucocorticoid receptor. *PLoS Genet*. 2007;3:0927–38.
- Block TS, Murphy TI, Munster PN, Nguyen DP, Lynch FJ. Glucocorticoid receptor expression in 20 solid tumor types using immunohistochemistry assay. *Cancer Manag Res*. 2017;9:65–72.
- Buxant F, Engohan-aloghe C, Noe J. Estrogen Receptor , Progesterone Receptor , and Glucocorticoid Receptor Expression in Normal Breast Tissue , Breast In Situ Carcinoma , and Invasive Breast Cancer. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2010;18:254–7.
- Skor MN, Wonder EL, Kocherginsky M, Goyal A, Hall BA, Cai Y, Conzen SD. Glucocorticoid receptor antagonism as a novel therapy for triple-negative breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2013;19:6163–72.
- Dai X, Li T, Bai Z, Yang Y, Liu X, Zhan J, Shi B. Breast cancer intrinsic subtype classification, clinical use and future trends. *Am J Cancer Res*. 2015;5:2929–43.
- Catteau X, Simon P, Buxant F, Noël J-C. Expression of the glucocorticoid receptor in breast cancer-associated fibroblasts. *Mol Clin Oncol*. 2017;5:372–6.
- Hegde SM, Kumar MN, Kavva K, Kumar KMK, Nagesh R, Patil RH, Babu RL, Ramesh GT, Sharma SC. Interplay of nuclear receptors (ER, PR, and GR) and their steroid hormones in MCF-7 cells. *Mol Cell Biochem*. 2016;422:109–20.
- Webster JC, Huber RM, Hanson RL, Collier PM, Haws TF, Mills JK, Burn TC, Allegretto EA. Dexamethasone and tumor necrosis factor-α act together to induce the cellular inhibitor of apoptosis-2 gene and prevent apoptosis in a variety of cell types. *Endocrinology*. 2002;143:3866–74.
- Lin KT, Wang LH. New dimension of glucocorticoids in cancer treatment. *Steroids*. 2016;111:84–8.
- Keith BD. Systematic review of the clinical effect of glucocorticoids on nonhematologic malignancy. *BMC Cancer*. 2008;8:84.
- Pan D, Kocherginsky M, Conzen SD. Activation of the glucocorticoid receptor is associated with poor prognosis in estrogen receptor-negative breast cancer. *Cancer Res*. 2011;71:6360–70.
- Sarlis NJ, Bayly SF, Szapary D, Simons SS. Quantity of partial agonist activity for antiglucocorticoids complexed with mutant glucocorticoid receptors is constant in two different transactivation assays but not predictable from steroid structure. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 1999;68:89–102.
- Moffitt KL, Walker B, Martin SL. Chymotrypsin-like serine proteinases are involved in the maintenance of cell viability. *Biochimie*. 2012;94:2582–9.
- Scott FL, Denault JB, Riedl SJ, Shin H, Renatus M, Salvessen GS. XIAP inhibits caspase-3 and -7 using two binding sites: evolutionary conserved mechanism of IAPs. *EMBO J*. 2005;24:645–55.
- Nestlé de Moraes G, Vasconcelos FC, Delbue D, Mognol GP, Sternberg C, Viola JPB, Maia RC. Doxorubicin induces cell death in breast cancer cells regardless of Survivin and XIAP expression levels. *Eur J Cell Biol*. 2013;92:247–56.
- Xu C, Yamamoto-Ibusuki M, Yamamoto Y, Yamamoto S, Fujiwara S, Murakami K, Okumura Y, Yamaguchi L, Fujiki Y, Iwase H. High survivin mRNA expression is a predictor of poor prognosis in breast cancer: a comparative study at the mRNA and protein level. *Breast Cancer*. 2014;21:482–90.
- Silke J, Meier P. Inhibitor of apoptosis (IAP) proteins-modulators of cell death and inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013;5.
- Mendoza-Milla C, Machuca Rodríguez C, Córdova Alarcón E, Estrada Bernal A, Toledo-Cuevas EM, Martínez Martínez E, Zentella Dehesa A. NF-kappaB activation but not PI3K/Akt is required for dexamethasone dependent protection against TNF-alpha cytotoxicity in L929 cells. *FEBS Lett*. 2005;579:3947–52.

45. Kim YS, Park JS, Jee YK, Lee KY. Dexamethasone inhibits TRAIL- and anti-cancer drugs-induced cell death in A549 cells through inducing NF-kappaB-independent cIAP2 expression. *Cancer Res Treat.* 2004;36:330–7.
46. Lee I-N, Cheng W-C, Chung C-Y, Lee M-H, Lin MH-C, Kuo C-H, Weng H-H, Yang J-T. Dexamethasone reduces brain cell apoptosis and inhibits inflammatory response in rats with intracerebral hemorrhage. *J Neurosci Res.* 2015;93:178–88.
47. Buxant F, Kindt N, Noël JC, Laurent G, Saussez S. Preexposure of MCF-7 breast cancer cell line to dexamethasone alters the cytotoxic effect of paclitaxel but not 5-fluorouracil or epirubicin chemotherapy. *Breast Cancer Targets Ther.* 2017;9:171–5.
48. Ozmen A, Unek G, Kipmen-Korgun D, Mendilcioglu I, Sanhal C, Sakinci M, Korgun ET. Glucocorticoid effects on angiogenesis are associated with mTOR pathway activity. *Biotech Histochem.* 2016;91:296–306.
49. Courtin A, Communal L, Vilasco M, Cimino D, Mourra N, De Bortoli M, Taverna D, Faussat AM, Chaouat M, Forgez P, Gompel A. Glucocorticoid receptor activity discriminates between progesterone and medroxyprogesterone acetate effects in breast cells. *Breast Cancer Res Treat.* 2012;131:49–63.
50. Kiessling S, Beaulieu-Laroche L, Blum ID, Landgraf D, Welsh DK, Storch K-F, Labrecque N, Cermakian N. Enhancing circadian clock function in cancer cells inhibits tumor growth. *BMC Biol.* 2017;15:13.
51. Dreos R, Ambrosini G, Périer RC, Bucher P. The eukaryotic promoter database: expansion of EPDnew and new promoter analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 2015;43:D92–6.
52. Dreos R, Ambrosini G, Groux R, Cavin Périer R, Bucher P. The eukaryotic promoter database in its 30th year: focus on non-vertebrate organisms. *Nucleic Acids Res.* 2017;45:D51–5.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions



Review Article

Genomic and non-genomic effects of glucocorticoids: implications for breast cancer

Irma B Mitre-Aguilar^{1,2}, Alberto J Cabrera-Quintero^{1,2}, Alejandro Zentella-Dehesa^{1,2,3}

¹Unidad de Bioquímica, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ), México D. F., México; ²Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), México D. F., México; ³Programa de Investigación de Cáncer de Mama, IIB, UNAM, México D.F. 04510, Mexico

Received November 12, 2014; Accepted December 24, 2014; Epub January 1, 2015; Published January 15, 2015

Abstract: Glucocorticoids (GC) are essential steroid hormones for human life. They regulate a series of important processes by binding with three glucocorticoid receptors (GR) and activating genomic and non-genomic pathways. Activated cytoplasmic GR can directly bind DNA and transactivate or transrepress specific genes. Additionally, it can interact with other transcription factors to affect gene expression indirectly. The two membrane GR can interact with mitogen-activated protein (MAP) kinases or activate cAMP and Ca²⁺-dependent pathways, respectively. Glucocorticoids have been widely used as co-treatment of patients with breast cancer (BC) due to reduction of chemotherapy-induced side effects such as nausea, lack of appetite, and inflammation. However, GC may exert a direct effect on tumor response to chemotherapy. *In vitro*, GC inhibits chemotherapy, radiation and cytokine-induced apoptosis by upregulating antiapoptotic genes and detoxifying proteins. They also upregulate the proto-oncogene c-fms, tumor suppressor gene *Nm23*, several members of the epidermal growth factor (EGF) signaling pathway and the estrogen sulfotransferase signaling pathway, thus indirectly inhibiting estrogen receptor activation. They inhibit the proangiogenic gene (vascular endothelial growth factor (VEGF); Therefore, they could play a role in reducing angiogenesis. Interestingly, the phosphorylation status of ser-211 in the GR is dependent on the expression of the *BRCA1* gene, a tumor suppressor gene that is mutated in the majority of patients with triple negative BC. Some clinical randomized trials have also attempted to address the effect of GC on patients with BC. Thus, in this review we summarize GC mechanisms of action and their participation in several facets of BC.

Keywords: Glucocorticoids, breast cancer, genomic, non-genomic, glucocorticoid membrane receptor

Introduction

The main physiological functions of glucocorticoids (GC) include downregulating the immunological function (immunosuppression), increasing the production of glucose [1], changing carbohydrate, protein, and lipid metabolism, regulating vascular tone, regulating bone mineralization, and affecting the central nervous system (CNS) [2, 3]. GC is released in response to stress conditions. Under such conditions, the hypothalamus secretes a corticotrophin-releasing hormone that stimulates the hypophysis gland. In turn, this gland produces the corticotrophin hormone that acts on the cortex of the suprarenal gland. It is here that GC are produced and secreted into the bloodstream, where they bind with globulins and are transported throughout the body [4]. This sys-

tem is known as the hypothalamic-pituitary-adrenal axis (HPA axis).

GC have genomic and non-genomic effects

Three main mechanisms of action for GC have been described. The first is the genomic mechanism, which involves a classic cytosolic GC receptor (GR), while the remaining two mechanisms are non-genomic. One uses the classic GR but bound to the plasma membrane, and the other is dependent on a non-classic membrane GR.

GR belongs to the family of steroid receptors

GR belong to the superfamily of nuclear receptors of transcription factors [5]. It relates to other steroid receptors, such as those for min-

Glucocorticoid implications in breast cancer

eralocorticoids, androgens, estrogens, progesterone, thyroid hormones, vitamin D, and retinoic acid [6]. All of these receptors are evolutionarily conserved in mammals and it has been proposed that they originated from the multiple duplication of a common ancestor gene 400 million years ago [7].

GR is essential for life, tissue-specific GR deletion

GR are essential for life; this has been proven in various murine models containing the mutated GR. Complete deletion of the second exon of the murine *GR* gene gives rise to severe anomalies in lung development, which lead to death a few hours after birth [8]. In the liver, the GR has proven to be responsible for gluconeogenesis [9]. In the CNS, GR deficiency causes irregularities in the HPA axis, and the development of a great number of physiological and behavioral changes that mimic depressive disorders [10].

GR gene and its alternative splicing

The *GR* gene in humans is located on the fifth chromosome (5p31q region) and has 9 exons. Its transcription is regulated by at least three promoters, which contain sites for the binding of diverse transcription factors. In mature messenger RNA (mRNA), exon 1 represents the 5' untranslated (UTR) region, exons 2-9 encode for the protein and the 3'UTR [4, 11, 12]. The following five isoforms of the human *GR* gene are known: GR α ; GR β ; GR γ ; GR-P, and GR-A [13]. The processing of exon 9 by alternative splicing produces the two most well-known isoforms: human GR α (hGR α), and human GR β (hGR β). The latter isoform has only 742 aa, permanently localizes to the nucleus, is transcriptionally inactive, cannot bind with any GC [14], and acts as an antagonistic form (dominant negative regulator) of GR α , but its physiological relevance is poorly understood [15]. Its overexpression has been associated with the development of cardiovascular disease, GC-resistant asthma, ulcerative colitis, and rheumatoid arthritis.

GR α isoform, the predominant physiological form, and its protein domains

On the other hand, Glucocorticoid receptor alpha (GR α) is the predominant isoform, and

mediates the classic GC effects [16]. It consists of 777 aa and has a molecular weight of 94 kDa (estrogen receptor α has only 66 kDa) [17]. The amino terminal side possesses a domain called the Transcriptional activation (AF-1) that plays a role in gene transcription and is hormone-independent. Near this domain, a leucine zipper has been discovered that is important in GC action [18]. In the central region of the GR lies the DNA binding domain (DBD) that has specificity for GC response elements (GRE). The DBD is composed of two zinc ions complexed with eight cysteines, a motif termed zinc fingers, which interacts with the major groove of the DNA double helix. Additionally, in the central domain lies the dimerization domain, which forms a helix that reacts with a similar domain in an identical receptor in order to dimerize. On the carboxyl terminus side we find the following: the ligand-binding domain; the nuclear importation and exportation sequences; heat shock protein-90 binding zones and, on the very end, the hormone-dependent transcriptional activation domain (AF-2) [19].

Genomic effect of GC

The genomic mechanism of GC is that which produces changes in the levels of the specific mRNA. These might result from changes in the transcription or changes of the half-life of the mRNA [20]. It involves the classical cytosolic GR α (cGR α) that, once coupled with the GC, translocates to the nucleus and interacts with DNA directly or indirectly by forming protein-protein complexes.

GR activation, nuclear translocation, and GRE

Because GC is lipophilic substances, they can easily go through the cell membrane and bind the cGR α , which is expressed in nearly every human cell. In the absence of its ligand, the cGR α is localized in the cytoplasm, complexed with Heat shock proteins/chaperones of 90 kDa (HSP-90), immunophilin, and other proteins. They block the Nuclear localization sequence (NLS) of the cGR α , thus inhibiting GR nuclear translocation. The GR bound to these proteins presents a three-dimensional (3-D) structure with three exposed domains, the HSP binding domain; the DNA binding domain, and the ligand binding domain. Once the GC binds the cGR α , the latter undergoes conformational changes and is phosphorylated by p38 MAP

kinase at serine 211. This serine is crucial for maximal transactivation of GC signaling. Other phosphorylatable serines have been identified at positions 203, 226, and 404; however, they have been associated with the inhibition of GC signaling [13]. After phosphorylation of the GR, an allosteric change is produced in the inhibitory complex of proteins mentioned earlier that promote their dissociation from the cGR α , allowing the NLS and the dimerization domain (DD) to be exposed. Consequently, the cGR α forms a homodimer with an identical cGR α , translocates to the nucleus, and binds GC response elements (GRE) in the promoters of its target genes. The majority of GRE are composed of a palindromic 15 bp conserved sequence 5'-AGAACANNNTGTTCT-3'. However GRE in some genes are one half of that size but have similar transcription activity. The number and localization of GRE in a specific promoter is highly variable. This conformation of the activated cGR α allows physical interaction with a variety of co-regulating factors and with chromatin [21, 22].

DNA binding-dependent transactivation mechanisms

Three mechanisms by which the cGR α can directly transactivate gene expression have been described. If the GRE is near a TATA box, the cGR α can recruit the general transcription factors (TAF), such as TAFIIID, and promote gene transcription [23]. On the other hand, if the GRE is located far from the TATA box, the cGR α can associate with co-activators that serve as bridges to promote recruitment of basal transcription machinery. Third, the cGR α can recruit chromatin remodeling complexes (CRC) to alter the nucleosomal structure of DNA, creating a favorable environment for gene transcription. These CRC are histone acetyltransferases (HAT), for example CBP, p300, PCAF, and SRC-1, or ATP-dependent CRC-like SWI/SNF. Examples of genes upregulated by GRE are tyrosine-aminotransferase, alanine-aminotransferase, and phosphoenolpyruvate-carboxykinase, all involved in gluconeogenesis of the liver [14, 24, 25]. The immunosuppressive anti-inflammatory effects of GC are mediated through the transrepression function of GR, whereas undesirable side effects, such as GC resistance, are thought to occur mainly through the activation of gene transcription [26].

Transrepression by direct DNA binding (negative GRE)

Interestingly, cGR α can also transrepress gene transcription by directly binding negative GRE (nGRE). nGRE are similar to the previously described GRE and are nearly always localized within the proximity of the binding sites of other transcription factors. This binding produces gene silencing by competition and displacement in the DNA of the other transcription factor [27]. An example can be found in the promoter of the osteocalcin gene. It contains an nGRE that overlaps with the TATA box, and the association of cGR α at this site prevents the binding of the transcription machinery. In the human *FASL* gene, the nGRE is adjacent to the nuclear factor-kappa B (NF- κ B) binding site; thus, the binding of cGR α does not allow binding of NF- κ B, and induces gene silencing. Even though GC represses one half of the genes that they regulate, it is known, only for some of these, that they are regulated by nGRE. Other genes regulated by nGRE include proopiomelanocortin, CRH, prolactin, and the serotonin neural receptor [14, 23]. The concentration of the GR and the specific ligand it encounters, such as Dex or Corticosterone, determines negative feedback on the HPA axis [28]. GC also regulates post-transcriptional events such as protein synthesis and secretion [15].

Transactivation independent of direct DNA binding (cross-talk with other transcription factors)

Alternatively, cGR α indirectly modulates gene transcription by interacting with other proteins in the nucleus, such as transcription factors like activated protein complex-1 (AP-1), nuclear factor of activated T-cells (NFAT), NF- κ B, and Signal transduction and transcription proteins (STAT). AP-1 is a heterodimer composed of c-jun and c-fos that promotes gene transcription, but activated cGR α inhibits AP-1 action by binding with the c-jun unit, transrepressing the transcription of the target genes such as collagenase, stromelysin, and other metalloproteinases. In the case of STAT, it has been shown that cGR α interacts physically with STAT-5 while it is directly associated with DNA, but cGR α does not bind with DNA, this allows the activation of a variety of genes [14, 29]. It is noteworthy that gene transrepression by cGR α appears to be

Glucocorticoid implications in breast cancer

attributable essentially to its direct protein-protein interaction with transcription factors of pro-inflammatory genes such as *AP-1*, *NF-κB*, and *Smad3*. Activated cGRα is able to interact with the p65 subunit of NF-κB or to stimulate, in some cells, the synthesis of inhibitors such as members of the IκB protein family, which prevent translocation of NF-κB to the nucleus. IκB also inhibits NF-κB gene transcription effects by directly inhibiting the histone acetylation function of CBP, p300, SRC-1, or by interfering with the phosphorylation of RNA polymerase II. In the case of *Smad*, cGRα reduces the transcriptional activity of the Smad 3-4 complex by an unknown mechanism [14].

Post-transcriptional regulation by GR, reducing mRNA half-life

GC is able to reduce the half-life of some mRNA, such as that of tumor necrosis factor (TNF), an important pro-inflammatory cytokine. This is due to that cGRα induces the expression of tristetrapoline (TTP), a protein with zinc-finger domain capable of binding mRNA that contain adenylate/uridylylate (ARE)-rich 3'UTR sequences [30]. These sequences are considered important cis-elements and are the most relevant and conserved group of functional sequences associated with mRNA stability and translation. The TTP-ARE association produces the rapid degradation of the target mRNA by recruiting specific RNases. These sequences are heterogenic, but in general form AUUUA pentamers. They can be found in different combinations, and occasionally the pentamer is not present [24, 20, 31, 32].

Non-genomic effects of GC

The wide range of actions of steroids cannot be explained only by their nuclear effects. Therefore, the hypothesis has been postulated that they possess non-genomic effects. These latter effects would include those produced at the level of the plasma membrane and the ion channels. Non-genomic effects were defined by Losel and Wehling as any action that does not affect gene expression initially or directly, but that does induce rapid effects, such as activation of signal transduction pathways. The short time that these take implies that the effects are unaffected by inhibitors of transcription and protein synthesis; they can occur in cells that do not have a nucleus, such as platelets,

erythrocytes, and sperm, and they can be triggered by steroid analogs (for example, bovine serum albumin [BSA] conjugated with steroid molecules) that cannot access the intracellular compartment (e.g., bind cGRα) [20, 33, 34]. In 2002, the Working Group at the FASEB Summer Conference on rapid steroid signaling suggested naming these effects Membrane-initiated steroid signaling (MISS), in contrast with genomic or Nuclear-initiated steroid signaling (NISS) [21]. However, in the literature, the former effects are described as non-genomic.

Ca²⁺, the second messenger of non-genomic GC effects

The second messenger most commonly involved in the non-genomic effects of steroid hormones is intracellular Ca²⁺. Its basal levels decrease rapidly in human bronchial epithelial cells treated with dexamethasone (Dex). Additionally, GC also affect actin polymerization, such as in the endometrial adenocarcinoma cells of Ishikawa and human T lymphocytes, where it even increases their migration capacities after treatment with 0.1 μM [20, 35]. Some therapeutic drugs specifically target the non-genomic pathway [36].

Classic membrane GR

To date, the non-genomic effects of GC have been described as involving two types of receptors: the well-known classic GR, but that localizes in the plasma membrane instead of in the cytosol (mGR), and the non-classic GR, also associated with the plasma membrane.

Classic mGR was identified in peripheral blood lymphomas and monocytes as a modified form of the cGRα [37]. It is recognized by antibodies developed against cGRα, has a similar capacity for binding HSP and DNA, and presents similar phosphorylation patterns [38]. However, it presents a different localization, molecular weight, and binding specificity to GC than cGRα [39, 40]. It regulates three signaling pathways. First, it has been shown that it can activate p42 MAPK [41]. Second, it has been demonstrated that it inhibits MAPK ERK1/2 in mice mastocytes, human osteoblasts, and T-cells. This inhibition occurs by different mechanisms; in mastocytes and osteoblasts, it is dependent on MAPK phosphatase-1 (MKP-1), while in human T-cells, it involves phosphorylation of Raf-1.

Glucocorticoid implications in breast cancer

Moreover, GC generate post-translational modifications on other MAPK, such as JNK/SAPK in smooth muscle cells of the respiratory tract [42, 43] and in murine macrophages. In primary cultures of hippocampal neurons, GC stimulates the PKC signaling pathway. In the heart, GC activates the PI3K/Akt pathway, which activates endothelial nitric oxide synthase (eNOS), and this produces nitric oxide (NO). In endothelial cells, the same pathway is turned on by Dexamethasone (Dex) [20]. In skin cancer, the mGR/PI3K complex possesses an antitumor effect [44]. A third pathway has been described that initiates by the activation of proteins with SH3 domains such as Src and Ras. The latter can activate the MAPK signaling pathway [24, 34, 45].

Non-classic membrane GR

The non-classic mGR is an acidic glycoprotein of 63 kDa that was identified in neuronal plasma membranes of the amphibian *Taricha granulosa* as a functional receptor of GC [14, 46]. It has completely different pharmacological characteristics from those of classic mGR. Additionally, it presents high-affinity binding for corticosterone, but not for hormones that classically bind GR, such as aldosterone and Dex [47]. It has seven alpha helices coupled with G proteins. Upon GC binding the receptor, the G proteins activate adenylate cyclase and phospholipase C (PLC) [45, 48]. The former in turn synthesizes cAMP, which activates PKA, which phosphorylates CREB, and pCREB translocates to the nucleus where it binds DNA elements and promotes gene transcription [49]. PLC induces the production of diacylglycerol (DAG) inositol triphosphate (IP3). DAG activates PKC and IP3 mobilizes the Ca²⁺ stored in the endoplasmic reticulum [34, 50, 51]. Other membrane-resident proteins capable of binding GC have been identified in the liver of chickens, rats, and mice. However, *in vitro* and *in vivo* experiments suggest that classic and non-classic mGR are the those that play a crucial role in mediating some of the neurophysiologic- and behavior-related non-genomic effects of GC [21, 50].

GC effect on breast tumor response to chemotherapy

Before, during, and after chemotherapy in patients with BC, GC, that is, cortisone, methylprednisolone, hydrocortisone, ketoprogesterone,

fluorometholone, prednisone, and prednisolone [52] are administered at various doses. These drugs reduce the secondary effects of chemotherapy, such as nausea and vomiting, and protect the normal tissue of patients with cancer against the long-term effects of genotoxic drugs [53]. This effect should not be observed as trivial, because a lack of control of these symptoms can cause the patient to abandon therapy. Additionally, these drugs reduce tumor-dependent effects on the patients' health, such as lack of appetite, electrolyte imbalance, pain, edema, and inflammation [53]. In combination with chemotherapy or another endocrine therapy in BC, Glucocorticoids (GC) increase the Response rate (RR), but do not change survival. Some tumor responses may be a consequence of anti-inflammatory activity rather than anti-tumor activity. GC is commonly administered with monoclonal antibodies used in BC therapy, such as Trastuzumab, which mediates antibody-dependent cellular cytotoxicity. However, there is evidence that GC may inhibit antibody-dependent cellular cytotoxicity [52].

In 1958, an increase in the frequency of metastases upon GC co-treatment was observed in patients with BC [54]. Some authors have associated the likelihood of developing metastases with GC therapy and suggest that patients who have been administered steroids may develop metastases due to the possible influence of immunosuppressive effects [54] that could inhibit immunosurveillance and allow tumor progression.

In vitro experiments suggest that Dex protects cancer cells from the cytotoxic effects of several chemotherapy agents, such as ionizing radiation, carboplatin, cisplatin, and actinomycin D [53]. It is noteworthy that the concentrations of GC utilized in these experiments is on the same order of magnitude as the plasma concentration of GC in patients with cancer observed a few hours after they receive a dose of GC. The mechanism by which GC induce chemotherapy resistance depends on the cytotoxic agent in question, but it has been shown that GC increase levels of several known key mediators of gene expression, such as the following: cellular glutathione content: metallothionein synthesis: multidrug resistance efflux pump ABCB1 and ABCG2 activity and gene expression, and O6-methylguanine DNA methyl transferase activity [2, 53].

Glucocorticoid implications in breast cancer

Moreover, it has been proven that GC-induced expression of the serine/threonine kinase, survival kinase gene (*SKG-1*) protects BC cells from apoptotic cell death. Therefore, it should be tested whether GC induce resistance to chemotherapy *in vivo* and in randomized clinical trials. If GC do convey chemotherapy resistance to patients, then the antiemetic effect is not worthwhile, and the need for non-steroidal antiemetic drugs without such secondary effects is urgent [53].

In one study of BC xenografts, Dex pre-treatment significantly reduced paclitaxel-induced apoptosis. Systemic Dex pre-treatment was found to upregulate the anti-apoptotic gene *MKP-1* while downregulating pro-apoptotic genes such as *Bid* and *TRAIL* in BC tumor cells, an effect that persisted for weeks. More recently, microarray analysis of Dex-induced anti-apoptotic genes in BC cell lines revealed *MKP-1* and *SGK-1* proteins to be of particular importance in GC-induced chemotherapy resistance in BC, with glucocorticoid treatment upregulating both of these genes [56]. Moreover, RNA interference (RNAi) knockdown of these genes abrogates the anti-apoptotic effects of GC in BC cells. Overall, potential mechanisms of action of GC signaling leading to anti-apoptotic events rather than to cell death include the activation of *MKP-1*, *NF-κB*, *SGK-1*, *ACK*, and *WNT* pathways. Clearly, the balance between GC-induced pro- and anti-apoptotic events in specific cell types plays an important role in cell death or survival, and the pros and cons of including GC in cancer treatments should be investigated further [56].

Dex protects MCF7 cells against the cytotoxic effects of *TNF-α* by inducing expression of Inhibitors of apoptosis (IAP) through an *NF-κB*-dependent pathway [57].

GC have also been shown to inactivate apoptosis pathways during normal mammary gland development [2].

GC, menopause, and chemotherapy

Several randomized clinical trials have addressed the question of whether a patient's menstrual status may be important with regard to the effectiveness of GC enhancement of the beneficial effects of chemotherapy. In order to do this, the trials have included pre- and post-menopausal women. The trials have concluded

that GC enhance chemotherapy more efficiently in post-menopausal than in premenopausal women, that there is no correlation between GC administration and estrogen receptor status, and that GC administration induces adrenocortical inhibition, which might reduce the synthesis of endogenous GC [52].

Role of endogenous GC in patients with breast cancer

However, contact with exogenous GC is not the only source to which a cancer is exposed. One's own body synthesizes endogenous GC as cortisol. This raises the question of what effect does endogenous GC have on non-hematologic malignancy. Therefore, future trials should measure the levels of endogenous GC in patients prior to treatment [52].

GR expression in human breast tissues

The presence or absence of GR in BC biopsies is controversial. GR is strongly expressed in metaplastic carcinomas and malignant tumors, but is not expressed in non-metaplastic carcinomas [2]. However, the percentage of positive patients presenting nuclear GR localization decreases significantly with the tumor's histological grade [26]. Although activated GR is located mainly in the nuclei, cytoplasmic or membrane GR localization does not implicate inactive GR status. Two membrane GRs (mGR) have been discovered that mediate GC non-genomic actions, activating different signaling pathways, and not requiring translocation to the nucleus to mediate these effects. Interestingly, it has been reported that in advanced BC samples, GR is localized within the cytoplasm and the mitochondria; the latter localization could be associated with an apoptotic inhibitory function [13].

GR and BCRA1

Interestingly the tumor suppressor *BRCA1* protein has recently been implicated in GC signaling upstream of *p38*. Triple negative BC cells with mutated tumor suppressor *BRCA1* possess reduced levels of phosphorylated serine 211 GR. The expression of *BRCA1* is crucial in order for GC to exert efficient signaling through GR P-Ser211 phosphorylation in MCF-7, a non-invasive BC cell line. This may be due to that *BRCA1* induces the phosphorylated form of *p38*. Additionally, in the absence of ligand, GR

Glucocorticoid implications in breast cancer

increases BRCA1 expression, whereas the addition of hydrocortisone downregulates BRCA1 expression in non-malignant mouse mammary cells [55]. The significance of this finding relates to the controversy of GR nuclear localization at different tumor-progression stages in BC. Perhaps screening for both BRCA1 and GR expression in tumor samples could be helpful, because tumors that do not express GR in the nucleus may not express BRCA1 and viceversa.

GR and ER

Interestingly, GR activation induced the expression and activity of estrogen sulfotransferase, an important enzyme for the deactivation of estrogens, because sulfonated estrogens fail to activate the estrogen receptor (ER) [26]. The synthetic GC Dex and the GR agonist medroxyprogesterone-acetate (MPA) elevate the breast carcinoma metastasis suppressor *Nm23-H1* gene in triple negative BC cells *in vitro* and reduce their migration capacities [58]. However, Dex treatment also upregulates the c-fms (CSF-1R) proto-oncogene in MDA-MB-231 cells, which is associated with an increase in cancer invasiveness [59].

GC inhibit EGF signaling of breast cancer in vitro

Deregulation of growth signaling pathways and acquired autonomy in growth signals are among the main characteristics that dictate malignant mammary cellular growth. One of the most active growth factors in breast glandular cell proliferation is the epidermal or endothelial growth factor (EGF). It exerts, via binding to the EGF receptor, potent growth-promoting effects in mammary epithelium and is involved in the proliferation and migration of BC cells. GC have been shown to increase EGF binding to its receptor, also accompanied by increases in epidermal growth factor-receptor (EGF-R) mRNA levels in human BC cell lines [2]. However, in MCF-7 cells, Dex treatment inhibits EGF-induced SK-1 mRNA expression and activity in a GR-dependent manner, resulting in reduced EGF-induced proliferation and migration [2].

GR and VEGF

GC has been shown to repress, in cancer cells, the expression of vascular endothelial growth

factor (VEGF), a potent pro-angiogenic factor. Because angiogenesis is a recognized tumor-promoting factor, further experiments should be conducted to test the possibility that GC do inhibit angiogenesis. The latter would redeem the GC effect on cancer [53].

Conclusions

For nearly 60 years, GC has been employed for their anti-inflammatory, immunosuppressive response. Despite extensive studies in several organ systems, little is known about the physiological role of GC and its GR.

Additionally, GC has been utilized as antiemetics in breast cancer therapy. The role of glucocorticoids in breast cancer is complex and unpredictable, and many contradictions have been demonstrated. The expression and activation levels of GR (phosphorylation status and localization), in BC tumors depends upon several factors, such as the degree of invasiveness of the tumor cell and the concomitant expression of other tumor markers. The addition of GC to other therapies does not change the long-term outcome. The implications of the use of GC as monotherapy or in combination with anti-cancer drugs for the clinical management of women with breast cancer needs to be further studied.

GC can activate a range of responses because they may act through genomic and non-genomic mechanisms by involving classic or the non-classic cytosolic receptor or the membrane receptor. This involves activation of signaling pathways and different key molecules in breast cancer that play an important role and that are very promising as therapeutic targets. To our understanding, little is known of the role of the membrane GR in breast cancer; therefore, there is a great opportunity for research in this area. Genomic and non-genomic pathways are currently considered as simultaneous but independent events; it could be that there are more links between them than those that we have described.

Ultimately, the future of the synthesis of novel synthetic GC developed through the application of knowledge obtained *in vitro* and *in vivo* offers the hope of a new era in which the adverse effects of glucocorticoids are infinitesimal compared to their benefits.

Acknowledgements

We would like to thank Vilma Maldonado Lagunas, Alfonso León del Río and Ignacio Camacho Arroyo, for critically reviewing this manuscript.

Disclosure of conflict of interest

None.

Address correspondence to: Dr. Alejandro Zentella-Dehesa, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Vasco de Quiroga 15, Tlalpan, Sección XVI, C.P.14000, México D. F., México. Tel: (+52) (55) 5573 0487; E-mail: azentell@biomedicas.unam.mx

References

- [1] Lecoq L, Vincent P, Lavoie-Lamoureux A and Lavoie JP. Genomic and non-genomic effects of dexamethasone on equine peripheral blood neutrophils. *Vet Immunol Immunopathol* 2009; 128: 126-31.
- [2] Moutsatsou P and Papavassiliou AG. The glucocorticoid receptor signalling in breast cancer. *J Cell Mol Med* 2008; 12: 145-63.
- [3] Simoncini T and Genazzani A. Non-genomic actions of sex steroid hormones. *Eur J Endocrinol* 2003; 148: 281-292.
- [4] Duma D, Jewell CM and Cidlowski JA. Multiple glucocorticoid receptor isoforms and mechanisms of post-translational modification. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2006; 102: 11-21.
- [5] De Bosscher K. Selective Glucocorticoid Receptor modulators. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2010; 120: 96-104.
- [6] Conzen SD. Minireview: nuclear receptors and breast cancer. *Mol Endocrinol* 2008; 22: 2215-28.
- [7] Clark AR, Martins JR and Tchen CR. Role of dual specificity phosphatases in biological responses to glucocorticoids. *J Biol Chem* 2008; 283: 25765-9.
- [8] Cole TJ, Blendy JA, Monaghan AP, Kriegstein K, Schmid W, Aguzzi A, Fantuzzi G, Hummler E, Unsicker K and Schütz G. Targeted disruption of the glucocorticoid receptor gene blocks adrenergic chromaffin cell development and severely retards lung maturation. *Genes Dev* 1995; 9: 1608-21.
- [9] Tronche F, Opherck C, Moriggl R, Kellendonk C, Reimann A, Schwake L, Reichardt HM, Stangl K, Gau D, Hoefflich A, Beug H, Schmid W, Schütz G. Glucocorticoid receptor function in hepatocytes is essential to promote postnatal body growth. *Genes Dev* 2004; 18: 492-7.
- [10] Boyle MP, Kolber BJ, Vogt SK, Wozniak DF and Muglia LJ. Forebrain glucocorticoid receptors modulate anxiety-associated locomotor activation and adrenal responsiveness. *J Neurosci* 2006; 26: 1971-8.
- [11] Lu NZ and Cidlowski JA. The origin and functions of multiple human glucocorticoid receptor isoforms. *Ann N Y Acad Sci* 2004; 1024: 102-23.
- [12] Zhou J and Cidlowski JA. The human glucocorticoid receptor: one gene, multiple proteins and diverse responses. *Steroids* 2005; 70: 407-17.
- [13] Vilasco M, Communal L, Mourra N, Courtin A, Forgez P and Gompel A. Glucocorticoid receptor and breast cancer. *Breast Cancer Res* 2011; 130: 1-10.
- [14] Revollo JR and Cidlowski JA. Mechanisms generating diversity in glucocorticoid receptor signaling. *Ann N Y Acad Sci* 2009; 1179: 167-78.
- [15] Arterbery AS, Fergus DJ, Fogarty EA, Mayberry J, Deitcher DL, Lee Kraus W and Bass AH. Evolution of ligand specificity in vertebrate corticosteroid receptors. *BMC Evol Biol* 2011; 11: 14.
- [16] De Bosscher K, Haegeman G and Elewaut D. Targeting inflammation using selective glucocorticoid receptor modulators. *Curr Opin Pharmacol* 2010; 10: 497-504.
- [17] Bai Z and Gust R. Breast cancer, estrogen receptor and ligands. *Arch Pharm (Weinheim)* 2009; 342: 133-49.
- [18] Ayroldi E and Riccardi C. Glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ): a new important mediator of glucocorticoid action. *FASEB J* 2009; 23: 3649-58.
- [19] Pujols L, Mullol J, Torrego A and Picado C. Glucocorticoid receptors in human airways. *Allergy* 2004; 59: 1042-52.
- [20] Stellato C. Post-transcriptional and nongenomic effects of glucocorticoids. *Proc Am Thorac Soc* 2004; 1: 255-63.
- [21] Bottino MC, Cerliani JP, Rojas P, Giulianelli S, Soldati R, Mondillo C, Gorostiaga MA, Pignataro OP, Calvo JC, Gutkind JS, Amornphimoltham P, Molinolo AA, Lüthy IA and Lanari C. Classical membrane progesterone receptors in murine mammary carcinomas: Agonistic effects of progestins and RU-486 mediating rapid non-genomic effects. *Breast Cancer Res Treat* 2011; 126: 621-636.
- [22] Rosen J and Miner JN. The search for safer glucocorticoid receptor ligands. *Endocr Rev* 2005; 26: 452-464.
- [23] Zen M, Canova M, Campana C, Bettio S, Nalotto L, Rampudda M, Ramonda R, Iaccarino L and Doria A. The kaleidoscope of glucorticoid effects on immune system. *Autoimmun Rev* 2011; 10: 305-10.
- [24] Stahn C and Buttgerit F. Genomic and nongenomic effects of glucocorticoids. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2008; 4: 525-33.

Glucocorticoid implications in breast cancer

- [25] Stahn C, Löwenberg M, Hommes DW and Buttgereit F. Molecular mechanisms of glucocorticoid action and selective glucocorticoid receptor agonists. *Mol Cell Endocrinol* 2007; 275: 71-8.
- [26] Buxant F, Engohan-aloghe C and Noe J. Estrogen Receptor, Progesterone Receptor, and Glucocorticoid Receptor Expression in Normal Breast Tissue, Breast In Situ Carcinoma, and Invasive Breast Cancer. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2010; 18: 254-257.
- [27] Adcock IM and Caramori G. Cross-talk between pro-inflammatory transcription factors and glucocorticoids. *Immunol Cell Biol* 2001; 79: 376-384.
- [28] van der Laan S, Lachize SB, Vreugdenhil E, de Kloet ER and Meijer OC. Nuclear receptor coregulators differentially modulate induction and glucocorticoid receptor-mediated repression of the corticotropin-releasing hormone gene. *Endocrinology* 2008; 149: 725-32.
- [29] Ring A and Dowsett M. Mechanisms of tamoxifen resistance. *Endocrine-Related Cancer* 2004; 11: 643-658.
- [30] Newton R. Molecular mechanisms of glucocorticoid action: what is important? *Thorax* no D. 2000. pp. 603-613.
- [31] Schäcke H and Rehwinkel H. Insight into the molecular mechanisms of glucocorticoid receptor action promotes identification of novel ligands with an improved therapeutic index. *Exp Dermatol* 2006; 15: 565-573.
- [32] Lu NZ and Cidlowski JA. Glucocorticoid receptor isoforms generate transcription specificity. *Trends Cell Biol* 2006; 16: 301-7.
- [33] Moenter SM and Chu Z. Rapid nongenomic effects of oestradiol on gonadotrophin-releasing hormone neurones. *J Neuroendocrinol* 2012; 24: 117-21.
- [34] Losel RM, Falkenstein E, Feuring M, Schultz A, Tillmann HC, Rossol-Haseroth K and Wehling M. Nongenomic steroid action: controversies, questions, and answers. *Physiol Rev* 2003; 83: 965-1016.
- [35] Koukouritaki SB, Margioris AN, Gravanis A, Hartig R and Stournaras C. Dexamethasone induces rapid actin assembly in human endometrial cells without affecting its synthesis. *J Cell Biochem* 1997; 65: 492-500.
- [36] Zhou J, Li M, Sheng CQ, Liu L, Li Z, Wang Y, Zhou JR, Jing ZP, Chen YZ and Jiang CL. A novel strategy for development of glucocorticoids through non-genomic mechanism. *Cell Mol Life Sci* 2011; 68: 1405-1414.
- [37] Gametchu B, Chen F, Sackey F, Powell C and Watson CS. Plasma membrane-resident glucocorticoid receptors in rodent lymphoma and human leukemia models. In *Steroids* 1999; 64: 107-119.
- [38] Bottino MC and Lanari C. Extra nuclear localization of steroid receptors and non genomic activation mechanisms. *Medicina (B. Aires)* 2010; 70: 173-184.
- [39] Powell CE, Watson CS and Gametchu B. Immunoaffinity isolation of native membrane glucocorticoid receptor from S-49++ lymphoma cells: biochemical characterization and interaction with Hsp 70 and Hsp 90. *Endocrine* 1999; 10: 271-280.
- [40] Giraldi T, Giovannelli P, Di Donato M, Castoria G, Migliaccio A and Auricchio F. Steroid signaling activation and intracellular localization of sex steroid receptors. *J Cell Commun Signal* 2010; 4: 161-72.
- [41] Ordóñez-morán P and Muñoz A. Nuclear receptors Genomic and non-genomic effects converge. *Cell Cycle* 2009; 11: 1675-1680.
- [42] Long F, Wang Y, Qi HH, Zhou X and Jin XQ. Rapid non-genomic effects of glucocorticoids on oxidative stress in a guinea pig model of asthma. *Respirology* 2008; 13: 227-232.
- [43] Alangari AA. Genomic and non-genomic actions of glucocorticoids in asthma. *Ann Thorac Med* 2010; 5: 133-139.
- [44] Leis H, Page A, Ramírez A, Bravo A, Segrelles C, Paramio J, Baretino D, Jorcano JL and Pérez P. Glucocorticoid Receptor Counteracts Tumorigenic Activity of Akt in Skin through Interference with the Phosphatidylinositol 3-Kinase Signaling Pathway. *Mol Endocrinol* 2004; 18: 303-311.
- [45] Leite-Dellova DC, Oliveira-Souza M, Malnic G and Mello-Aires M. Genomic and nongenomic dose-dependent biphasic effect of aldosterone on Na⁺/H⁺ exchanger in proximal S3 segment: role of cytosolic calcium. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008; 295: F1342-F1352.
- [46] Rose JD and Moore FL. A neurobehavioral model for rapid actions of corticosterone on sensorimotor integration. In *Steroids* 1999; 64: 92-99.
- [47] Orchinik M, Murray TF and Moore FL. A corticosteroid receptor in neuronal membranes. *Science* 1991; 252: 1848-1851.
- [48] Benten WP, Lieberherr M, Sekeris CE and Wunderlich F. Testosterone induces Ca²⁺ influx via non-genomic surface receptors in activated T cells. *FEBS Lett* 1997; 407: 211-214.
- [49] Han JZ, Lin W and Chen YZ. Inhibition of ATP-induced calcium influx in HT4 cells by glucocorticoids: Involvement of protein A. *Acta Pharmacol Sin* 2005; 26: 199-204.
- [50] Falkenstein E, Tillmann HC, Christ M, Feuring M and Wehling M. Multiple actions of steroid hormones—a focus on rapid, nongenomic effects. *Pharmacol Rev* 2000; 52: 513-556.
- [51] Löwenberg M, Stahn C, Hommes DW and Buttgereit F. Novel insights into mechanisms of glucocorticoid action and the development of

Glucocorticoid implications in breast cancer

- new glucocorticoid receptor ligands. *Steroids* 2008; 73: 1025-1029.
- [52] Keith BD. Systematic review of the clinical effect of glucocorticoids on nonhematologic malignancy. *BMC Cancer* 2008; 8: 84.
- [53] Rutz HP. Effects of corticosteroid use on treatment of solid tumours. *Lancet* 2002; 360: 1969-70.
- [54] Herr I and Marme A. Glucocorticoids and Progression of Breast Cancer Commentary ND ES SC. December. 2005. pp. 1415-1416.
- [55] Vilasco M, Communal L, Hugon-Rodin J, Penault-Llorca F, Mourra N, Wu Z, Forgez P and Gompel A. Loss of glucocorticoid receptor activation is a hallmark of BRCA1-mutated breast tissue. *Breast Cancer Res Treat* 2013; 142: 283-96.
- [56] Gruver-Yates AL and Cidlowski JA. Tissue-specific actions of glucocorticoids on apoptosis: a double-edged sword. *Cells* 2013; 2: 202-23.
- [57] Machuca C, Mendoza-Milla C, Córdova E, Mejía S, Covarrubias L, Ventura J and Zentella A. Dexamethasone protection from TNF-alpha-induced cell death in MCF-7 cells requires NF-kappaB and is independent from AKT. *BMC Cell Biol* 2006; 7: 9.
- [58] Ouatas T, Halverson D and Steeg PS. Dexamethasone and medroxyprogesterone acetate elevate Nm23-H1 metastasis suppressor gene expression in metastatic human breast carcinoma cells: new uses for old compounds dexamethasone and medroxyprogesterone acetate elevate Nm23-H1 metastasis suppressor. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 3763-72.
- [59] Toy EP, Lamb T, Azodi M, Roy WJ, Woo HH and Chambers SK. Inhibition of the c-fms proto-oncogene autocrine loop and tumor phenotype in glucocorticoid stimulated human breast carcinoma cells. *Breast Cancer Res Treat* 2011; 129: 411-9.