



**Universidad Nacional Autónoma de
México**

**Facultad de Estudios Superiores
Iztacala**

Título del trabajo:

**Análisis del metabolismo energético regulado por
la actividad de los receptores a estrógenos
activados por 17β -estradiol en carcinoma
mamario humano MCF-7.**

Que para obtener el título de

Bióloga

P R E S E N T A

Ingrid Itzayanna Ortega Mejia

Directoras de Tesis:

Dra. Silvia Cecilia Pacheco Velázquez

Dra. Sara Rodríguez Enríquez



Los Reyes Iztacala, Edo. De México, 2020



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.

Agradecimientos a:

Mi tutora Silvia Cecilia Pacheco Velázquez, por:

Su constante orientación, sugerencias y valiosos comentarios en cada una de las etapas al realizar mi tesis; brindándome paciencia, confianza, cariño y un abrazo cada que lo necesite. Su atención, plena dedicación y conocimientos dejan una enorme huella en sus alumnos y cada una de sus cualidades la hace destacar como una excelente tutora, profesora, amiga y para mí una mamá en el laboratorio.

Dra. Sara Rodríguez Enríquez por el apoyo incondicional y consejos, otorgando retroalimentación en cada seminario y por ser una excelente doctora empeñada en formar investigadores de calidad. Y finalmente por el apoyo económico durante mi estancia.

Dr. Javier Alejandro Belmont García por ser un doctor siempre dispuesto a dar un poco de su tiempo para aclarar mis dudas, discutir mis opiniones y brindarme sus conocimientos, agradezco cada uno de sus consejos y el ánimo que me transmitía siempre para hacer las cosas y motivarme a ser mejor cada día en lo que hago, convirtiendo esta relación en una grandiosa amistad.

Dr. Juan Carlos Gallardo Pérez y Dr. Álvaro Marín Hernández por sus consejos y retroalimentación en seminario.

Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chavez”.

Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM.

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)

Apoyo SEP-CONACyT No. 283144

Abreviaturas

ALDO; aldolasa

ATCC; colección Americana de Cultivos “Tipo” (del inglés *American Type Culture Collection*)

ATP; trifosfato de adenosina

ATP-asa; *ATP-synthase*

Ca Ma; cáncer de mama

c-MYC; oncogen celular homólogo al del virus de mielocomatosis aviar

COX; citocromo oxidasa

DMEM; medio Eagle modificado por Dulbecco, (del inglés *Dulbecco's modified Eagle's Medium*)

DTT; ditionitrotol

E2; 17 β -estradiol o estrógeno

EDTA; ácido etilendiaminotetraacético

ENO; enolasa

FO; fosforilación oxidativa

GAPDH; gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa

GLUT; transportador de glucosa

Her-2; receptor del factor de crecimiento epidérmico en humano tipo 2

HIF-1 α ; isoforma-1 α del factor inducible por hipoxia

HK; hexocinasa

INEGI; Instituto Nacional de Estadística y Geografía

LDH; lactato deshidrogenasa

mRNA; ácido ribonucleico mensajero

NAD⁺; forma oxidada del dinucleótido de nicotinamida y adenina

NADH; forma reducida del dinucleótido de nicotinamida y adenina

ND1; NADH deshidrogenasa o complejo I

NRF1; factor de respiración nuclear 1 (del inglés *Nuclear respiratory factor 1*)

OMS; Organización Mundial de la Salud

PBS; buffer de fosfatos (del inglés *phosphate buffered saline*)

PFK; fosfofructocinasa

PGC1 α ; proteína 1 α coactivadora del receptor activado por el proliferador de peroxisomas

PMSF; fluoruro de fenilmetilsulfonilo (del inglés *phenylmethylsulfonyl fluoride*)

PYK; piruvato cinasa

RE; receptor de estrógeno

RE α ; receptor a estrógeno α

RE β ; receptor a estrógeno β

TAM; tamoxifen

TP; Triple negativo

TPI; triosa fosfato isomerasa

Resumen

Introducción: El cáncer de mama (Ca Ma) es la principal causa de morbilidad y mortalidad por cáncer en mujeres mexicanas y se divide en 4 subtipos (receptor estrógeno positivo (RE+), Triple positivo (TP), Her2+, Triple negativo (TN)), de los cuales el subtipo RE+ es el que presenta mayor incidencia (50-70%) en pacientes Ca Ma. La exposición a 17β -estradiol (estrógeno o E2) se asocia con el desarrollo y progresión de este subtipo de cáncer. El receptor a estrógeno α ($RE\alpha$) participa en la iniciación y el desarrollo del Ca Ma y es considerado como el biomarcador más utilizado en la clínica para detectar los Ca Ma con RE sobre expresados. El Ca Ma $RE\alpha+$ puede ser clínicamente controlado por el tamoxifen (TAM), un inhibidor selectivo de los receptores a estrógeno (RE). Sin embargo, la administración prolongada de TAM causa diversos efectos secundarios como son náuseas, mareos, vómitos, disnea, infecciones bacterianas, incluso cáncer de cérvix; además, después de 12 meses, el Ca Ma $RE\alpha+$ desarrolla resistencia al tratamiento y una alta recurrencia tras su uso; por lo que es necesario proponer nuevas estrategias terapéuticas para el manejo de esta enfermedad. Los RE son factores transcripcionales cuya activación promueve procesos de proliferación y diferenciación en células tumorales. Recientemente, los RE se han propuesto como activadores del metabolismo energético tumoral, pero en dichos estudios no se ha llevado a cabo un análisis integral del metabolismo energético que involucre el flujo glucolítico, el flujo de fosforilación oxidativa, los cambios en el contenido de proteínas y el aporte de ATP proveniente de cada flujo. Por lo tanto, este trabajo de tesis está enfocado a dilucidar los cambios en las vías energéticas del tumor inducidos por el 17β - estradiol (E2) para proponer estrategias terapéuticas alternativas que evite la progresión de este tipo de cáncer. Para lo anterior se utilizará como modelo de estudio a la línea celular MCF-7 porque es una línea RE+ de carcinoma mamario humano.

Resultados: La exposición a 10 y 100 nM de 17β -estradiol promovió un aumento substancial en la velocidad de proliferación de 20% en las células de mama RE+ MCF-7. El tiempo de duplicación disminuyó 28 % de 59 h a 46 y de 59 a 49 h con 10 y 100 nM de estradiol, respectivamente. La adición de 100 nM de estradiol incrementó los niveles de proteína (0.4-1.6 veces vs. control) de $RE\alpha$, $RE\beta$, HIF-1- α y c-MYC (factores transcripcionales asociados a la activación glucolítica) y de sus proteínas glucolíticas blanco (0.3-1.4 veces vs. control)

GLUT III, HKI y HKII y LDH-A. En contraste, acorde con el aumento del contenido de proteínas glucolíticas el estradiol aumentó la producción de lactato de 11 ± 3 nmol/min*mg de proteína en la condición control a 26 ± 7 nmol/min*mg de proteína en 100 nM. Por otra parte, la disminución del consumo de oxígeno total no fue significativa (de 24 ± 6 a 15 ± 6 ngAtO/min*mg de proteína) al comparar la condición control y la de 100 nM. De igual forma, la glucólisis aumentó de 9 ± 1 nmol/min*mg de proteína en la condición control a 23 ± 7 en la condición de 100 nM; mientras que la glutaminólisis (2 ± 3 a 3 ± 1 nmol/min*mg de proteína) y la fosforilación oxidativa (FO) (10 ± 2 a 8 ± 2 ngAtO/min*mg de proteína) se mantienen en ambas condiciones. Con estas observaciones se determinó un aumento del 25% en el aporte del ATP por parte de la glucólisis celular.

Conclusión: El E2 promueve la proliferación, aumenta la glucólisis y disminuye el aporte de ATP por parte de la FO (sin modificar su flujo de consumo de oxígeno), en una línea celular RE+ (MCF-7).

Índice

Introducción	1
<u>1. Epidemiología del cáncer de mama</u>	1
<u>2. Receptores a estrógeno</u>	3
<u>3. Reprogramación del metabolismo energético mediada por estrógeno</u>	5
Justificación	8
Hipótesis	8
Objetivos	8
Materiales y métodos	9
<u>1. Cultivo celular</u>	9
<u>2. Curva de crecimiento</u>	9
<u>3. Análisis de proteínas mediante el método de Western blot (WB)</u>	9
<u>4. Flujos glucolíticos</u>	10
<u>5. Flujos mitocondriales</u>	11
<u>6. Análisis estadístico</u>	11
Resultados	12
<u>1. Crecimiento de MCF-7 a diferentes concentraciones de E2</u>	12
<u>2. Contenido de proteína de factores transcripcionales</u>	13
<u>3. Contenido de proteína de enzimas glucolíticas y mitocondriales</u>	14
<u>4. Flujos glucolíticos y mitocondriales</u>	15
<u>5. Flujos de glucólisis, glutaminólisis y FO</u>	16
<u>6. Aporte de ATP proveniente del flujo glucolítico y flujo de FO</u>	18
Discusión	19
Conclusión	23
Bibliografía	24

Introducción.

1. Epidemiología del cáncer de mama

El cáncer de mama (Ca Ma) es la neoplasia más común en la población femenina de los países en desarrollo y la mayoría de los casos se diagnostican en fases avanzadas (Organización Mundial de la salud, 2016). En México el Ca Ma es la principal causa de morbilidad y mortalidad hospitalaria por tumores malignos en la población femenina mayor a 35 años (Figura 1). A pesar del aumento en las campañas de prevención y diagnóstico oportuno se ha observado un incremento de 31 % en el número de decesos por esta enfermedad durante los últimos 16 años (INEGI, 2015).

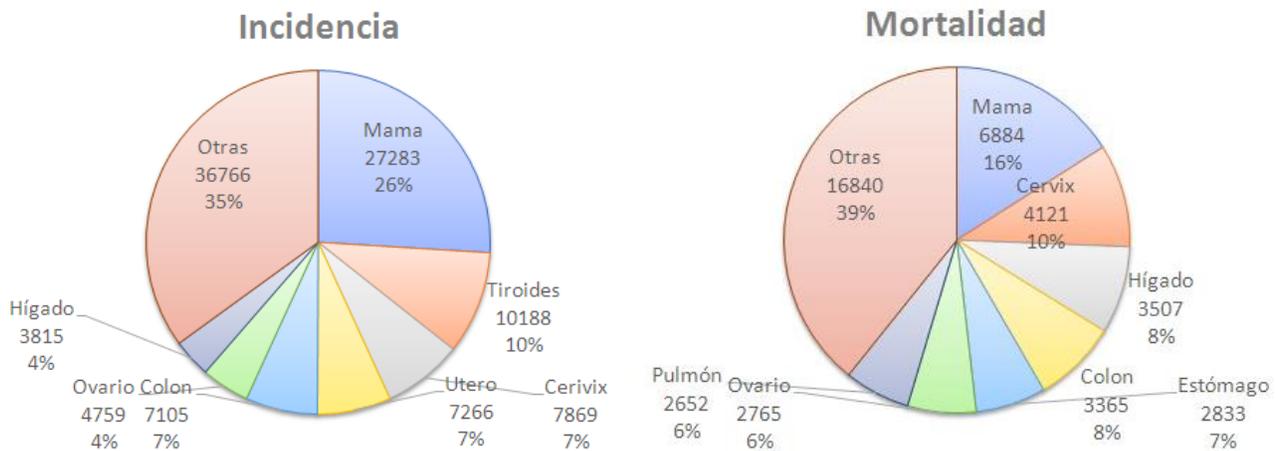


Figura 1 Incidencia y Mortalidad de neoplasias malignas para la población femenina en México (GLOBOCAN, 2018).

Entre los factores de riesgo más importantes para el desarrollo del Ca Ma está la exposición prolongada a estrógenos endógenos; principalmente el 17 β -estradiol (E2) (Organización Mundial de la Salud, 2016). Las evidencias epidemiológicas y experimentales que involucran a los estrógenos en la etiopatogenia de la enfermedad incluyen a la menarquia precoz, la menopausia tardía, la nuliparidad y la obesidad (Fernández-Santander *et al.*, 2007; Noriega-Reyes, 2008). Por ejemplo, cada dos años de demora en la menarquia se asocia con una reducción del 10% del riesgo a padecer Ca Ma (Hsieh *et al.*, 1990). Por otra parte, cada año

de retraso en el inicio de la menopausia confiere un aumento del 3% en el riesgo de desarrollar Ca Ma (Hsieh *et al.*, 1990; Kelsey *et al.*, 1993). Aunado a esto, las mujeres postmenopáusicas que desarrollan Ca Ma exhiben niveles de estrógenos circulantes 15% superiores a las que no lo desarrollan (Thomas *et al.*, 1997). Otro caso son las mujeres nulíparas, que tienen un mayor riesgo de desarrollar cáncer de seno en comparación con las mujeres *parous*. En comparación con las mujeres nulíparas, la incidencia acumulada de Ca Ma en las mujeres que tuvieron a su primer hijo a los 20 y 25 años fue un 20% y 10% menor, sin embargo, a los 35 años esta aumenta 5% (Rosner *et al.*, 1994).

La selección del tratamiento para el Ca Ma se basa en el análisis inmunohistoquímico; y permiten clasificar al Ca Ma considerando la expresión o ausencia de; 1) el RE (RE+ o RE-), 2) el receptor de progesterona (RP+ o RP-), y 3) del receptor al factor de crecimiento epidérmico en humano tipo-2 (HER-2+ o HER2-) (Wolff *et al.*, 2018; Figura 2). De estos biomarcadores, el receptor a estrógeno alpha (RE α) está sobre expresado en el 50-70% de los tumores de Ca Ma por lo que es el receptor más estudiado en la iniciación y el desarrollo del Ca Ma (Pérez-Sánchez *et al.*, 2008; Leung *et al.*, 2014; Zhao *et al.*, 2019). El RP, también es un marcador ampliamente usado en conjunto con el RE (Ca Ma triple positivo; TP), aunque su valor pronóstico no está completamente establecido. Por su parte, el HER-2 se ha convertido en el biomarcador, evaluado de forma rutinaria, asociado a un mal pronóstico (Pérez-Sánchez *et al.*, 2008).

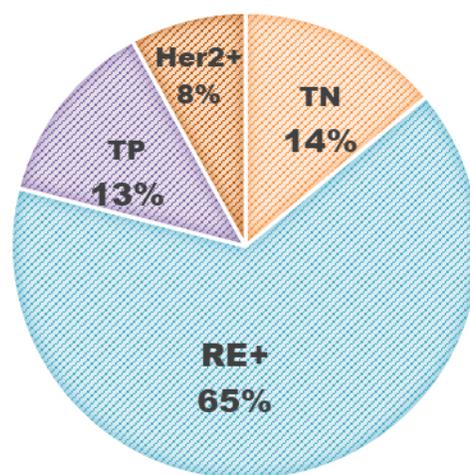


Figura 2. Clasificación principal de los subtipos de carcinoma mamario: Abreviaturas: Receptor estrógeno positivo (RE+), Triple positivo (TP), Receptor al factor de crecimiento epidérmico en humano tipo 2 positivo (Her2+), Triple negativo (TN).

Una estrategia para tratar el Ca Ma RE+; es inhibir la unión del ligando (E2) con el receptor. El tamoxifen que es un inhibidor selectivo para los RE y presenta una reducción del 50% en la reincidencia de Ca Ma durante los 5 años que dura el tratamiento (Bryant *et al.*, 2001; Fernández-Santander *et al.*, 2007). Sin embargo, el tamoxifen causa diversos efectos secundarios (*i.e.* náuseas, mareos, vómitos, disnea, infecciones bacterianas, y cáncer de cérvix) los cuales llevan a la suspensión del tratamiento en un 20-50% de las pacientes (Aiello Bowles *et al.*, 2012). Aunado a esto, la recurrencia de Ca Ma es del 45% a cinco años del término del tratamiento (Chang, 2012). El tamoxifen ha sido objeto de análisis y debate en los últimos años ya que la eficacia de este compuesto y su toxicidad varían enormemente entre individuos (Fernández- Santander *et al.*, 2007); por lo que es necesario proponer nuevas estrategias terapéuticas para el manejo de esta enfermedad.

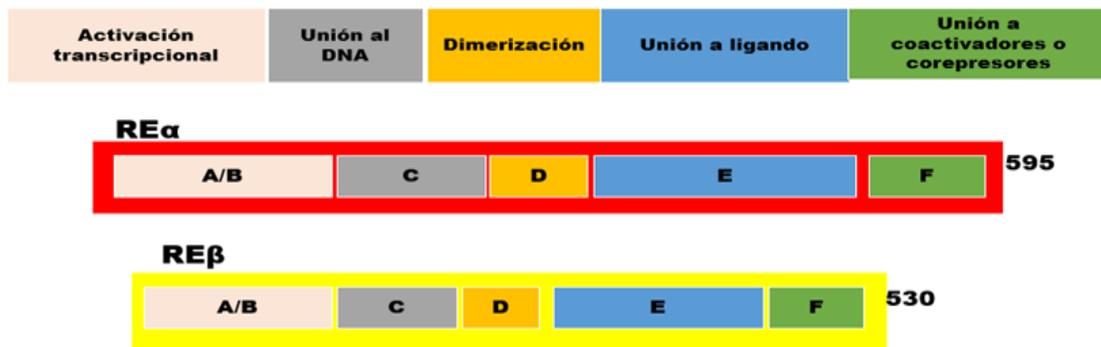
2. Receptores a estrógeno

El receptor de estrógeno pertenece a una superfamilia de receptores nucleares que funcionan como factores transcripcionales y están conformados por seis dominios denotados del A al F (Börjesson *et al.*, 2013). El dominio A/B es el de activación transcripcional, se ubica en el extremo amino terminal y es susceptible a modificaciones postraduccionales. El dominio C es el de unión al DNA, es capaz de identificar e interactuar con las regiones promotoras de genes regulados por estrógenos. Por su parte, el dominio D contiene la región bisagra que permite acoplar a los dominios C y E, además cuenta con la región de señalización hacia el núcleo. El dominio E constituye el sitio de unión a ligando, reconoce a los estrógenos naturales como el E2 y a ligandos sintéticos que pueden activar o inhibir al receptor, adicionalmente presenta la interfase de dimerización con un segundo receptor de estrógeno. Finalmente, el dominio F es la región moduladora de la actividad transcripcional, permite la interacción con los coactivadores y media la dimerización y la estabilidad del receptor (Klinge, 2001; Noriega-Reyes, 2008; Yaşar *et al.*, 2016) (Figura 3A).

Los RE se dividen en RE alpha (RE α), RE beta (RE β) y el RE transmembranal GPR30 (Figura 3B) (Noriega- Reyes, 2008). De estos tres los RE α son los más estudiados ya que están sobre expresados en aproximadamente el 70% de los tumores malignos de mama (Noriega-Reyes, 2008; Pérez-Sánchez *et al.*, 2008). Al igual que otros miembros de esa

subfamilia, la interacción con el E2 activa al receptor, promoviendo una serie de cambios conformacionales que incluyen dimerización, localización nuclear, interacción con coactivadores transcripcionales con el objetivo de asociarse a secuencias específicas del ADN conocidas como elementos de respuesta estrogénica y así regular la transcripción de proteínas involucradas en procesos de proliferación, (ciclina 1; CDK1), diferenciación (factor de crecimiento endotelial, EGF), dinámica mitocondrial (Mnf1 y drp1), vascularización (factor de crecimiento endotelial-vascular, VEGF), entre otras (Figura 3B) (Dontu *et al.*, 2004; Sastre-Serra *et al.*, 2012). Sin embargo, el mecanismo exacto de oncogénesis de los RE permanece incierto (Klinge, 2001; Börjesson *et al.*, 2013; Cai *et al.*, 2013).

A)



B)

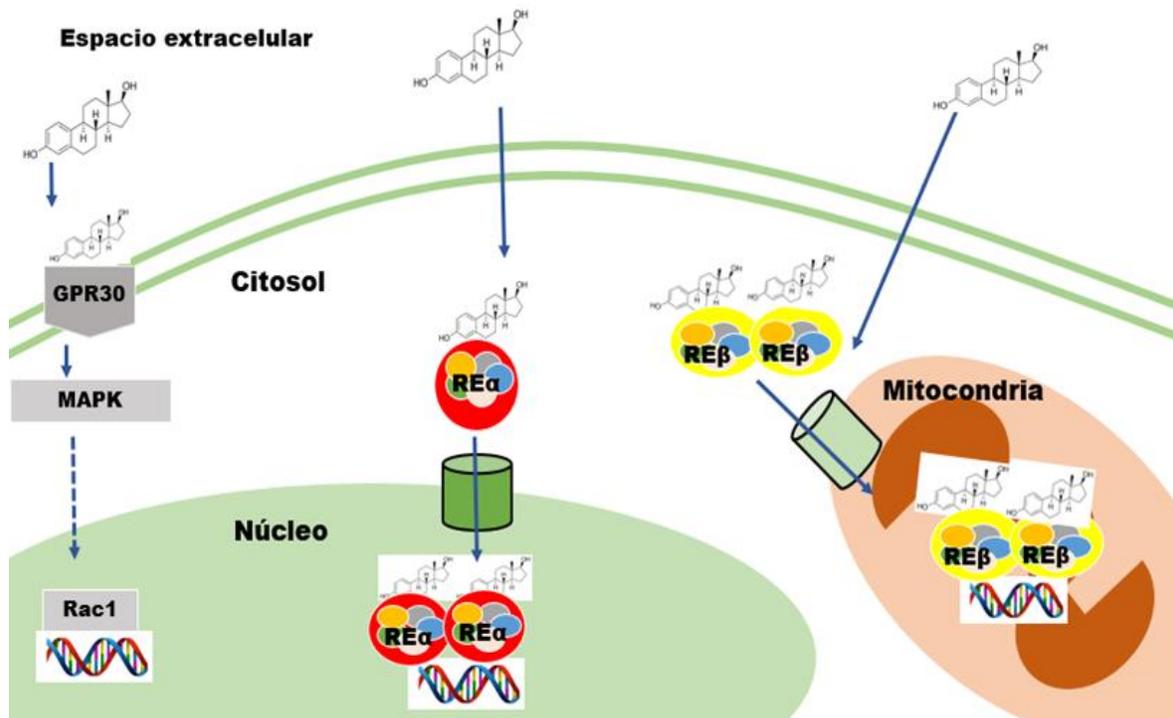


Figura 3 A) Dominios de unión, B) localización de los receptores de estrógeno.

3. Reprogramación del metabolismo energético mediada por estrógeno

Las células tumorales presentan una reprogramación en su metabolismo energético, aumentando la glucólisis aún en condiciones aerobias (efecto Warburg) y activando el metabolismo mitocondrial. El incremento en ambos flujos metabólicos les confiere una ventaja proliferativa al generar fuentes energéticas y macromoléculas (esqueletos de carbono; ácidos grasos y aminoácidos) para favorecer los procesos biosintéticos (Moreno-Sánchez *et al.*, 2007, Hanahan & Weinberg, 2011).

En el caso del Ca Ma, la activación de los RE α y β en la línea celular MCF-7, modulan positivamente la expresión de 1) factores transcripcionales asociados al metabolismo glucolítico y a la biogénesis mitocondrial (HIF1- α , c-MYC, NRF-1 y PGC1 α), 2) proteínas glucolíticas (aumentan 2-7 veces los niveles de las hexocinasa I y II, la fosfofructocinasa 2, la enolasa y la lactato deshidrogenasa B), y 3) proteínas mitocondriales (aumentan 2-3 veces la NADH-deshidrogenasa y las subunidades I, III, IV de la citocromo oxidasa), al interactuar directamente con los elementos de respuesta a estrógeno de sus secuencias genéticas (Tabla 1; Cai *et al.*, 2013; Imbert-Fernández *et al.*, 2014, Liao *et al.*, 2015). Por esta razón algunos autores sugieren que ambas vías metabólicas (glucólisis y fosforilación oxidativa) pueden beneficiarse de manera simultánea (O'Mahony *et al.*, 2012; Cai *et al.* 2013); pues atribuyen el aumento en el contenido de mRNA o contenido de proteína con un incremento en las actividades y flujos. Sin embargo, no se ha realizado una evaluación completa e integral donde se incluyan los análisis del contenido de mRNA y proteína en conjunto con la función (actividades o flujos). Esto es importante a considerar ya que no siempre la sobre expresión de una proteína va ligado a un aumento en su actividad o en el flujo (Moreno-Sánchez *et al.*, 2016). En relación con los flujos, el consumo de glucosa aumenta significativamente (2 veces) a concentraciones de 10 nM de E2 (Imbert-Fernandez *et al.*, 2014; O'Mahony *et al.*, 2012) mientras que el consumo de oxígeno mitocondrial presenta un aumento del 0.2 veces en presencia de la hormona; sugiriendo con esto un aumento de la FO (Radde *et al.*, 2016). Sin embargo, en ambos estudios no se analizaron los flujos en presencia de inhibidores (2-desoxyglucosa y oligomicina) para descartar los procesos no asociados a la glucólisis y a la FO (Pacheco-Velázquez *et al.*, 2018). Con estas consideraciones, este proyecto evaluará el efecto de la activación de los RE mediada por el E2 sobre el metabolismo energético tumoral midiendo 1) el contenido de proteína de enzimas

y transportadores de la glucólisis y del metabolismo mitocondrial; y 2) los flujos glucolíticos y de FO en una línea de carcinoma mamario RE+.

Línea celular y tratamiento de E2	Medición	Conclusión	Referencia
MCF-7 y T47D 10 nM y 100 nM E2 1,3,6 h	-Contenido de PFKFB3 (mRNA) -F26BP -Consumo de glucosa -Actividad de enolasa	Glucólisis: A partir de las 3 horas y con 10 nM de E2 PFKFB3: ↑ 4 veces F26BP: ↑ 0.5 veces Consumo de glucosa y la actividad de la enolasa: ↑ 200 veces FO:-----	(Imbert-Fernandez <i>et al.</i> , 2014)
MCF-7 10 nM E2	-Nivel de expresión de HKII, PKM2 LDH (mRNA)	Glucólisis: ↑ HKII ↑ PKM2 ↑ LDH FO: -----	(Cai <i>et al.</i> 2013).
SH-SY5Y, MCF-7 y A549 100 nM E2, 3, 6, 24 h	-Citocromo oxidasa I, III, IV (mRNA) -Consumo total de oxígeno	Glucólisis: ----- FO: COX-IV↑1.3 veces Consumo de oxígeno ↑ 2.4 veces	(Liao <i>et al.</i> , 2015).
MCF-7 0.1,1,10 nM E2 por 15 min	Producción de lactato total, citrato, y actividad de la PDH	Glucólisis: A E2 10 nM la concentración de lactato total ↑ 4 veces FO: La actividad de PDH ↓ un 50% concentración de citrato ↓ un 50%	(O'Mahony <i>et al.</i> , 2012)
MCF-7 y T47D 10nM E2- 24h.	-Ácidificación extracelular -Consumo total de oxígeno (Oligo 1.5μM)	Glucólisis: se mantiene FO :↑ 0.2 veces %	(Radde <i>et al.</i> , 2016)

Tabla 1 Modificaciones del metabolismo energético inducidas por los receptores a estrógenos Abreviaturas: ↑ (aumento), ↓ (disminución), - ---- (no determinado), COX-IV (citocromo oxidasa), F26BP (fructosa 2,6-bisfosfato), HKII (hexocinasa tipo 2), LDH (lactato deshidrogenasa), PDH (piruvato deshidrogenasa), PFKFB3 (gen que codifica la enzima 6-fosfofructo-2-quinasa / fructosa-2,6-bifosfatasa 3), PKM2 (piruvato cinasa tipo 2).

Justificación

El Ca Ma es la principal causa de mortalidad por cáncer en la población femenina a nivel mundial. Entre estos el subtipo RE+ es el más frecuente. No existe un análisis sistémico de las modificaciones en metabolismo energético tras la activación de los RE. Dado que la dependencia energética de las células tumorales es alta para sostener los procesos de proliferación y malignidad; el dilucidar los mecanismos de activación y regulación del metabolismo energético permitirá en un futuro encontrar un posible blanco terapéutico y proponer nuevas y mejores estrategias de tratamiento dirigidas a este subtipo de Ca Ma.

Hipótesis:

El 17β -estradiol tendrá un efecto positivo sobre el metabolismo energético del Ca Ma ER+; por lo tanto, se espera encontrar un aumento en los flujos de glucólisis y de fosforilación oxidativa.

Objetivo general:

Evaluar el efecto del 17β -estradiol sobre la glucólisis y fosforilación oxidativa en el carcinoma mamario humano MCF-7.

Objetivos particulares:

- 1) Determinar el efecto del 17β -estradiol sobre la proliferación tumoral de MCF-7.

- 2) Determinar el efecto del 17β -estradiol sobre el metabolismo energético de MCF-7.
 - Evaluar los cambios en el contenido de proteínas glucolíticas y mitocondriales.

 - Cuantificar los flujos de glucólisis y de fosforilación oxidativa en presencia de 17β -estradiol.

 - Determinar el aporte de ATP proveniente de la glucólisis y de la fosforilación oxidativa en las células expuestas a estrógeno.

Materiales y métodos.

1.Cultivo celular

La línea celular de carcinoma mamario humano tipo epitelial RE+, MCF-7 (ATCC® HTB-22™), fue incubada en medio DMEM (Dublecco's Modified Eagle's Medium) con 25 mM de glucosa, 10% de SFB (suero fetal bovino) y 10,000 unidades penicilina/estreptomicina en condiciones estándar de cultivo a 37° y 95% aire/ 5% CO₂. Las células se tripsinizaron al alcanzar 80-90% de confluencia para los experimentos posteriores (Rodríguez-Enríquez *et al.*, 2010).

2.Curva de crecimiento

Para la generación de las curvas de crecimiento 500,000 células se sembraron en cajas petri de plástico (60 x15 mm) en medio DMEM con concentraciones crecientes de E2 (0.1, 1, 10, 100 nM). La viabilidad y el número de células se monitoreó cada 24 horas durante 7 días empleando azul de tripano 0.01% y una cámara de Neubauer (Pacheco-Velázquez *et al.*, 2018).

El cálculo de los tiempos de duplicación para la curva de crecimiento se determinó con la fórmula: Donde NF representa el número de células cultivadas al final de la fase de crecimiento exponencial, NI representa el número de células al comienzo de la curva de crecimiento, tF es el tiempo en el que se recolectaron las células (día 7) y tI es el tiempo de cultivo inicial. * P <0.05 vs. la condición control (McAtter & Davis, 1994).

3.Análisis de proteínas mediante el método de Western blot (WB)

Las células, después de ser expuestas a E2 durante 7 días, se lavaron con buffer de fosfatos (PBS), se rasparon y centrifugaron a 2600 rpm por 3 minutos. El botón celular se mezcló en 250-500 µl de amortiguador de Tris (Tris-HCl 25mM pH 7.6 con DTT 5mM, EDTA 1mM y PMSF 1mM) y se ejerció presión mecánica para lisar las células. Las muestras se centrifugaron a 10,000 rpm durante 30 minutos. Del sobrenadante generado, se cuantificó el contenido de proteína por el método de Lowry y se almacenó a -20° C hasta su uso.

Para el ensayo de WB se cargaron 50 µg de proteína en un gel de SDS-PAGE al 12% de poliacrilamida y se electrotransfirieron a membranas de PVDF (BioRad; Hercules, CA, USA). Posteriormente las membranas se incubaron con anticuerpos monoclonales (Santa Cruz; CA, USA, dilución 1:1000) *anti* -β-actina (SC-8432), -REα (SC-710664), -REβ (SC-53494), -HIF-1α (SC-71247), -c-MYC (SC-40), -GLUT1 (SC-1605), -GLUT3 (SC-74399), -HK-I (SC-46695), -HK-II (SC-130358), -LDH-A (SC-137243), -ND1 (SC-65237), -COX-IV (SC-376731), -ATP -asa (SC-166462). (Rodríguez-Enríquez *et al.*, 2010). Las bandas de hibridación se revelaron con su anticuerpo secundario correspondiente (Santa Cruz; CA, USA, dilución 1:2000) *anti* -goat (SC-2006) y -mouse (31450) (Invitrogen™, dilución 1:2000) conjugado a peroxidasa de rábano y se detectó la señal de la proteína con el sistema ECL-plus (Amersham; Buckinghamshire, UK). El análisis densitométrico se realizó con el software *Scion Image* (Scion Corp Frederic, MD, USA) y cada proteína se normalizó contra el control de carga (β-actina) asignándole un valor de 100%.

4. Flujos glucolíticos

Las células se cuantificaron el contenido de proteína por el método de Biuret (2-5 mg/ml), se incubaron en buffer Ringer Krebs a 37°C en agitación orbital. Se adicionó glucosa (5 mM) al buffer para iniciar la reacción de glucólisis y generar lactato como metabolito final. En un set de experimentos en paralelo las células se incubaron previamente en presencia de 2-desoxiglucosa (20 mM) para revelar la producción de lactato de la glutaminólisis. En ambas condiciones, la reacción fue detenida con 10% de ácido perclórico frío a los minutos 0, 10 y 15. Las muestras ácidas se neutralizaron con una solución de KOH (3 M) y Tris (0.1 mM) y se almacenaron a -70°C hasta su uso. El lactato formado se cuantificó a 340 nm con un espectrofotómetro modelo Agilent 8453 con arreglo de diodos. En un volumen total de 2 ml de buffer hidrazina (0.4 M) y glicina (0.5 M) a pH 9.0, se agregaron 1 mM de NAD⁺ y 40 µl de una dilución 1:4 de LDH (Roche). Una vez que se obtuvo una línea basal se adicionó 50 µl de la muestra ácida neutralizada. Se calculó diferencia de absorbancias, y se obtuvo la concentración de lactato producido considerando el coeficiente de extinción molar del NADH (6.22 mM⁻¹), el volumen de la muestra y el tiempo de reacción (Rodríguez-Enríquez *et al.*, 2010).

5. Flujos mitocondriales

Las células se cuantificarán el contenido de proteína por el método de Biuret (4 mg/ml), se incubaron en buffer Ringer Krebs saturado con aire y a 37°C en una cámara de reacción (volumen de 1.9 ml) acoplada a un electrodo tipo Clark y se midió el consumo de oxígeno, polarográficamente, a través del tiempo. Para las mediciones de la fosforilación oxidativa, se evaluó el consumo de oxígeno en presencia 5 μ M de oligomicina. El cero químico se consiguió reduciendo todo el oxígeno con ditionita. Los cálculos de velocidad de consumo de oxígeno se realizaron considerando que en la ciudad de México a 37° C hay disueltos 380 nanogramo átomos de oxígeno (ngAtO) por ml de Ringer Krebs (Rodríguez-Enríquez *et al.*, 2010).

6. Análisis estadístico

Los experimentos se realizaron con un mínimo de tres preparaciones independientes. Los datos mostrados reflejan el promedio \pm la desviación estándar (SD). Se usaron las pruebas t de student y ANOVA con prueba post hoc Scheffé para identificar diferencias entre la condición control y la experimental. Los resultados con valores de $P < 0.05$ fueron considerados como estadísticamente significativos (Klockars & Hancock 2000; Krzywinski & Altman, 2014).

Resultados

1. Crecimiento de MCF-7 a diferentes concentraciones de E2

MCF-7 es una línea celular de carcinoma mamario epitelial RE+, derivado del sitio metastásico: derrame pleural (ATCC® HTB-22™). Los receptores de estrógeno promueven la proliferación al ser activados por su ligando, el E2 (Carroll, 2016). En este proyecto, las células fueron cultivadas a distintas concentraciones de E2 (0.1, 1, 10, 100 nM). La presencia de la hormona aumentó significativamente la proliferación de la línea celular MCF-7 en el rango de 10 y 100 nM a partir del día 3 (Figura 4). Por consiguiente, los tiempos de duplicación disminuyeron significativamente (20%) en las mismas concentraciones; (Tabla 2), con valores de 49 horas para 10 nM y 46 horas con la adición de 100 nM en comparación con la condición control (59 horas). Esto indica que E2 promueve la proliferación celular.

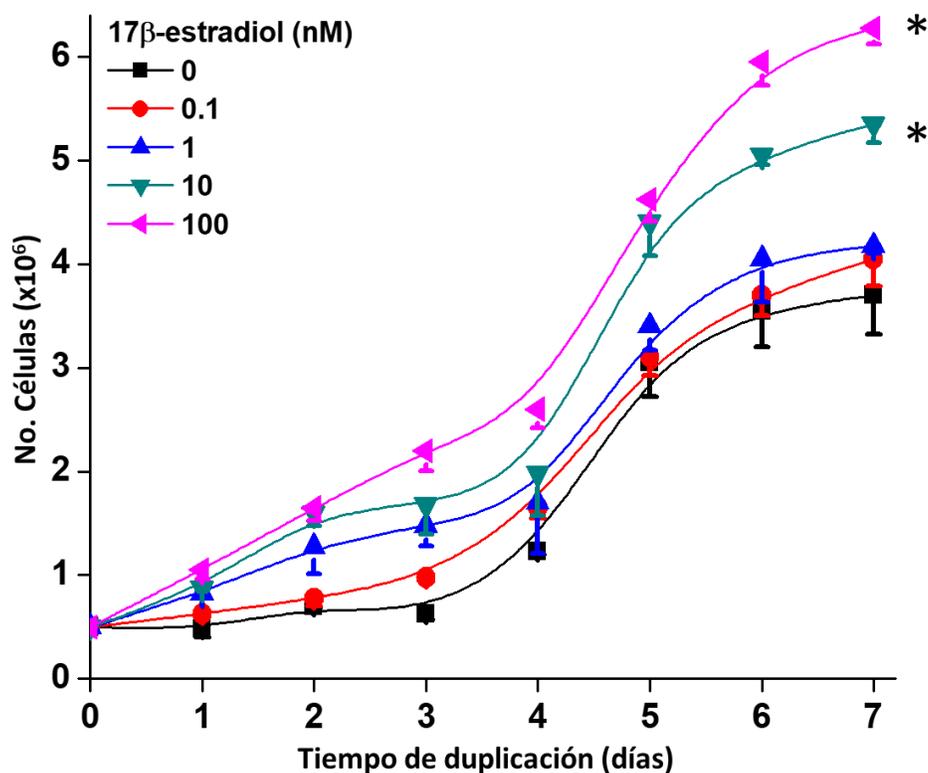


Figura 4 Crecimiento de MCF-7 en normoxia a concentraciones crecientes logarítmicas de E2. Los datos mostrados representan la media ± S.D. de tres preparaciones diferentes. * P < 0.05 vs la condición control

Condición 17β- estradiol (nM)					
	Control	0.1	1	10	100
Tiempo de duplicación (horas)	59 ± 3	57 ± 2	57 ± 0.4	49 ± 0.6*	46 ± 4*
Tasa de duplicación (μ) (días ⁻¹)	0.37 ± 0.02	0.42 ± 0.03	0.49 ± 0.05	0.58 ± 0.01	0.79 ± 0.01

Tabla 2 Tiempos de duplicación de MCF-7 a concentraciones crecientes de E2.

Los tiempos de duplicación se determinaron con la fórmula: $n = \frac{1}{[3.32(\log N_f - \log N_i)] / (t_f - t_i)}$ Donde N_F representa el número de células cultivadas al final de la fase de crecimiento exponencial, N_i representa el número de células al comienzo de la curva de crecimiento, t_F es el tiempo en el que se recolectaron las células (día 7) y t_i es el tiempo de cultivo inicial. * P <0.05 vs. la condición control (McAtter& Davis, 1994).

Al identificar las condiciones óptimas de crecimiento en presencia E2 (10 y 100 nM), se evaluó el efecto de este compuesto en el contenido de proteína de 1) factores regulatorios del metabolismo energético 2) proteínas glucolíticas y 3) proteínas mitocondriales, los cuales son activados por los RE.

2. Contenido de proteína de factores transcripcionales.

Los RE (REα y REβ) están codificados en diferentes genes y su expresión varía dependiendo del órgano o tejido (Noriega *et al.*, 2008). Ambos receptores aumentaron su expresión (REα 0.48-0.81 y REβ 1.53-1.63 veces) en la línea celular MCF-7 en presencia del E2 (Figura 5). Los RE activan la transcripción de factores transcripcionales relacionados con la carcinogénesis y el metabolismo energético como son HIF-1α y c-MYC (Bland Ki, *et al.*, 2007). En este estudio, el contenido de proteína de ambos factores transcripcionales aumentó en las condiciones con E2 (HIF-1α 0.38-0.75 veces y c-MYC 0.41-0.59 veces). Esto sugiere un aumento en el contenido de proteínas glucolíticas ya que HIF-1α aumenta la transcripción de casi todos los genes dentro de la vía glucolítica (Marín-Hernández *et al.*, 2009).

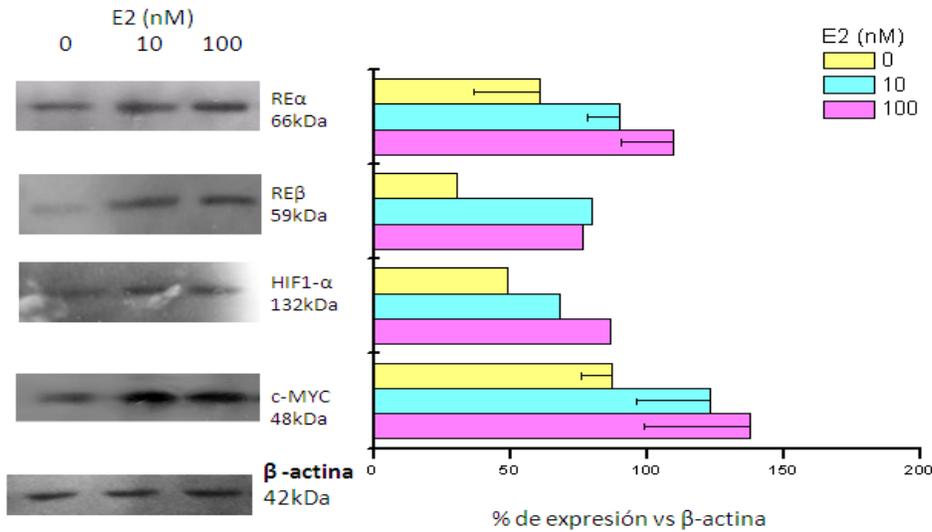
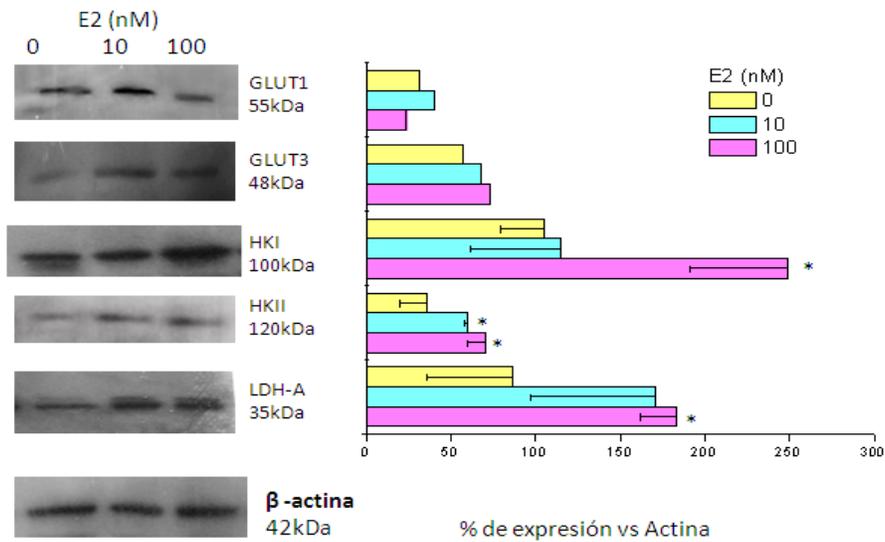


Figura 5 Contenido de proteínas: factores de transcripción reguladores del metabolismo energético. Las bandas se presentan en % de expresión vs β-actina. Promedio ± D.E., n=1-5, * P < 0.05 vs. Control Prueba ANOVA con post hoc Tukey.

3. Contenido de proteína de enzimas glucolíticas y mitocondriales.

El E2 favorece la captación de glucosa y aumenta el contenido de proteína de las enzimas glucolíticas GLUT3, HKI, HKII, enolasa y LDH en células de Ca Ma RE+ (Imbert-Fernández *et al.*, 2014). Se analizaron las proteínas glucolíticas GLUT1, GLUT3, HKI, y HKII al ser enzimas que ejercen un control alto en el flujo de vía glucolítica (GLUT1, HKI, HKII, cerca de un 60%), mientras que LDH-A se encuentra sobre-expresada en la mayoría de los tumores (Marín- Hernández *et al.*, 2011). En la figura 6A se muestran un aumento en las enzimas glucolíticas al exponer las células con la hormona (0.3-1.37 veces), a excepción de GLUT1. Esto sugiere un aumento en el flujo glucolítico. Por otra parte, el E2 aumenta la expresión de las enzimas mitocondriales, ND1 y COX-IV (Cai *et al.*, 2013; Imbert-Fernández *et al.*, 2014, Liao *et al.*, 2015). Estas enzimas se analizaron como puntos estratégicos en el metabolismo mitocondrial. En la Figura 6B se observa que el contenido de proteína del complejo 1 (principal sitio de control de la FO en células tumorales; Rodríguez-Enríquez *et al.*, 2000) no se modifica mientras que COX-IV y ATP-asa tienen una ligera tendencia a disminuir (10-30%), esto sugiere que el metabolismo mitocondrial no tendrá cambios.

A)



B)

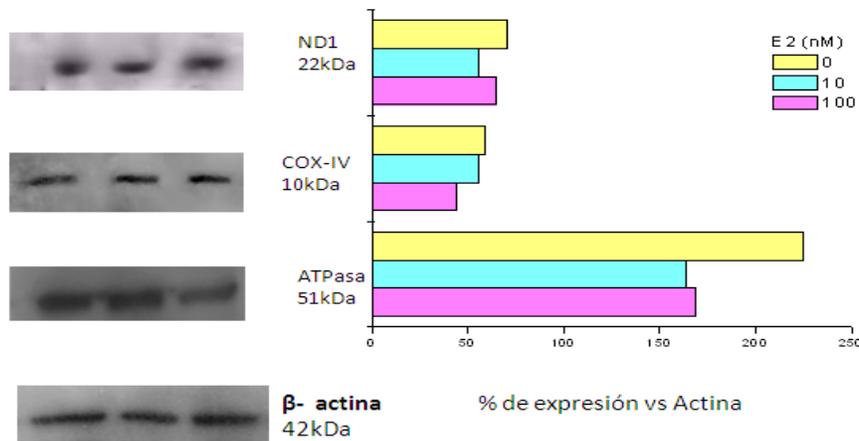


Figura 6. Contenido de proteínas A) glucolíticas y B) mitocondriales. Las bandas se presentan en % de expresión vs β -actina. (Promedio \pm D.E., n=1-5, * P < 0.05 vs. Control. Prueba ANOVA con post hoc Tukey).

4. Flujos glucolíticos y mitocondriales

Una vez que se caracterizaron los cambios en el contenido de proteína de enzimas glucolíticas y mitocondriales se prosiguió a cuantificar la producción de lactato, y los flujos de glucólisis y glutaminólisis, además del consumo de oxígeno y la FO, en las células expuestas a E2 para evaluar si la función también estaba modificada (Figura 7 y 8).

A la par del incremento en las proteínas glucolíticas la producción de lactato total aumenta (1.5 veces) por la activación de los RE en ambas condiciones de E2 (10 y 100 nM). Este efecto se puede atribuir a que el E2 aumenta la captación de glucosa de células de Ca Ma ER+ (Imbert-Fernández *et al.*, 2014) Sin embargo, el consumo de oxígeno total no tuvo ninguna modificación y considerando que los cambios en el contenido de las proteínas mitocondriales no eran significativos o incluso presentaban una ligera tendencia a disminuir (10-30%) se puede sugerir una relación entre la expresión de las enzimas con su función.

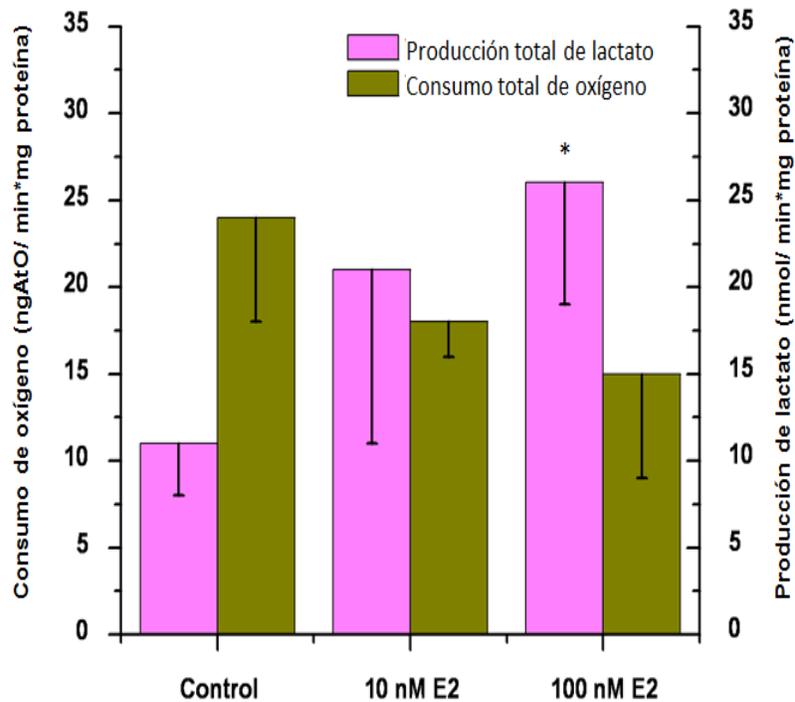


Figura 7 Gráfica de producción total de lactato y consumo total de oxígeno (promedio \pm D.E., n=5, * P <0.05 vs. Control, Prueba ANOVA con post hoc Tukey).

5. Flujos de glucólisis, glutaminólisis y FO

Considerando los experimentos anteriores y las evidencias que relacionan el aumento de las enzimas glucolíticas con un aumento en el flujo (Cai *et al.* 2013; Imbert-Fernandez *et al.*, 2014; O'Mahony *et al.*, 2012) se analizaron los flujos de glucólisis y glutaminólisis. Se empleó glucosa (5 mM) para estimular el flujo de glucólisis y 2-desoxiglucosa (20 mM) en paralelo, el cual actúa como un inhibidor de la hexosa fosfato isomerasa, parando así el flujo glucolítico

corriente arriba de la glucólisis. El flujo glucolítico aumenta 0.2-0.5 veces en presencia del E2, mientras que la glutaminólisis se mantiene en todas las condiciones (Figura 8).

Al observar un aumento en el flujo de glucólisis se prosiguió a medir el flujo de FO, considerando los reportes donde la FO aumenta 0.2 veces (Radde *et al.*, 2016), y estudios que contradicen el efecto mencionando, indicando que la FO llega a disminuir hasta un 50% (O'Mahony *et al.*, 2012) en condiciones de 10 a 100 nM de E2 a tiempos de exposición menores a 24 horas.

La FO se calculó al obtener los valores de respiración total en ausencia y en presencia de oligomicina (5µM), el cual inhibe el consumo de oxígeno asociado a la FO al bloquear el canal de protones en la fracción "F0" de la ATP-synthase. En ninguna condición se observó un cambio por el E2 respecto a la condición control (Figura 8), lo que es comparable con la ausencia de cambio en el contenido de proteína de las enzimas mitocondriales (Figura 6).

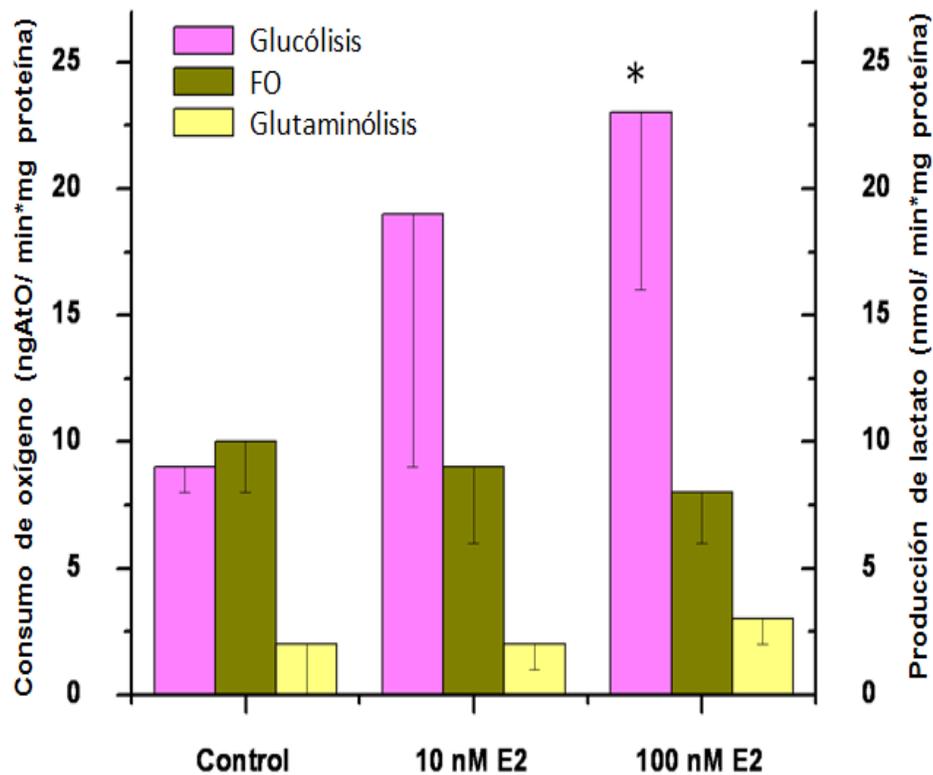


Figura 8 Gráfica de flujos de glucólisis, fosforilación oxidativa y glutaminólisis (promedio \pm D.E., n=5, * P <0.05 vs. Control Prueba ANOVA con post hoc Tukey).

6. Aporte de ATP proveniente del flujo glucolítico y de FO

La glucólisis aerobia, le confiere a la célula maligna una ventaja proliferativa al generar fuentes energéticas (ATP) e intermediarios de carbono para la biogénesis de macromoléculas (Valle & Soto, 2014). Recientemente se ha reconocido que el metabolismo mitocondrial está activo en cáncer y en algunos tumores llega a ser la principal fuente de aporte de ATP (Zu & Guppy, 2004, Moreno-Sánchez *et al.*, 2014). Este fenómeno se repite en este estudio en la línea celular MCF-7 que, en condiciones de normoxia, presenta un mayor aporte energético por parte de la FO (75%). Sin embargo, tras adicionar E2 (10 y 100 nM) ocurre una redistribución del aporte energético del 50% por ambas vías, como lo muestra la Figura 9.

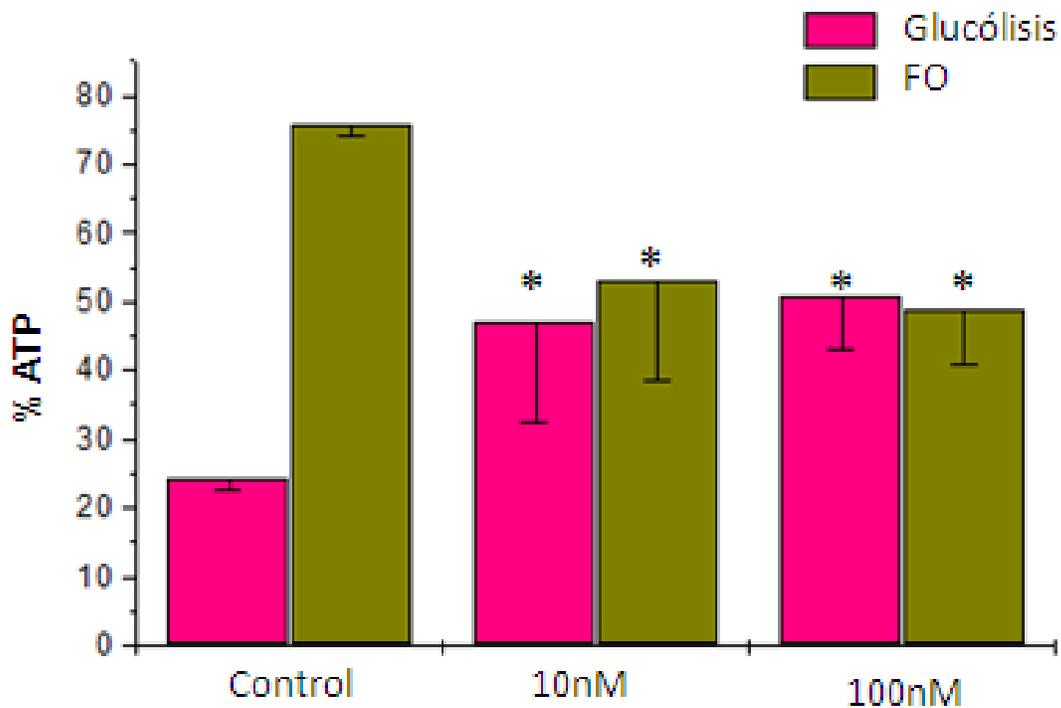


Figura 9. Aporte de ATP (%) por la glucólisis y la FO. El porcentaje se calculó considerando 1 nmol de lactato/ min*mg proteína es equivalente a 1 ATP y 1 ngAtO/ min*mg proteína es equivalente a 2.5 ATP (promedio \pm D.E., n=5, * P <0.05 vs. Control Prueba ANOVA con post hoc Tukey).

Discusión

Efecto del estrógeno sobre la proliferación celular

Los RE actúan como factores transcripcionales nucleares, reclutando coactivadores para iniciar la transcripción de genes involucrados en; ciclo celular, diferenciación, proliferación y metabolismo (Alberts, 2014). En células tumorales no se ha reportado una diferencia en el crecimiento celular (Briand & Lykkesfeldt., 1984; Butler *et al.*, 1981). Sin embargo, en estos estudios se trabajó con células transferidas a medio bajo en suero o con niveles elevados de insulina (que cambia la sensibilidad de las células MCF-7 a estrógenos) (Briand & Lykkesfeldt., 1984). En contraste, este trabajo muestra un efecto positivo del E2 en la proliferación celular a concentraciones de 10 nM a 100 nM en comparación con las células no expuestas. Esto se adecua perfectamente con otros estudios que atribuyen al E2 un efecto estimulante en la proliferación de la línea celular MCF-7; y cuando se somete a condiciones de estrés (paclitaxel, o radiación UV) se observó una protección celular tras la adición de la hormona (Migliaccio *et al.*, 1996; Razandi *et al.*, 2000).

Modificación del contenido de proteínas, factores transcripcionales, glucolíticas, mitocondriales mediadas por el estrógeno.

Actualmente se han identificado dos receptores de estrógenos conocidos como RE α y RE β (Noriega- Reyes, 2008). Ambos receptores se localizan en distintos organelos como: membrana plasmática, membrana nuclear, núcleo celular y matriz mitocondrial (Levin, 2005). Chambliss *et al.*, 2002. han identificado a ambos receptores en las caveolas y las membranas celulares de las células endoteliales.

Algunos autores mencionan que la línea celular MCF-7 es RE α + y RE β - (Drabovich *et al.*, 2016), información que difiere con los resultados de este trabajo, con lo reportado en la ATCC[®] y con Buteau-Lozano *et al.*, 2002. En este estudio, tras adicionar E2 se observa un aumento en el contenido de proteína de RE α y β , lo que comprueba la presencia de ambos (Figura 5).

Los RE aumentan la expresión de 103 proteínas y se reportan alrededor de 40 genes que tienen elementos de respuesta a hormonas (Drabovich *et al.*, 2016). Entre ellos, c-MYC, un oncogén fuertemente relacionado con carcinogénesis (Bland Ki, 2007) En este trabajo se

observó un aumento de 0.75 veces en c-MYC a concentraciones 100 nM de E2. Esto concuerda con otros estudios donde observan una sobreexpresión de c-MYC en la misma línea celular a menor concentración de E2 (1 nM; Yu J *et al.*, 2004). c-MYC regula positivamente genes glucolíticos (HKII, PFK-1, TPI, GAPDH, ENO, LDH-A, MCT1) (revisado en Rodríguez-Enríquez *et al.*, 2019).

Por otro lado, el factor inducible por hipoxia 1 α (HIF-1 α) coopera con las células de cáncer de mama RE+ ya que tiene elementos de respuesta a estrógeno (Yang J *et al.*, 2015) y está involucrado en resistencia contra apoptosis, sobreexpresión de proteínas expulsoras de fármacos, remodelación vascular, angiogénesis, y metástasis (Marín-Hernández *et al.*, 2009; Rodríguez-Enríquez *et al.*, 2014). HIF-1 α aumenta con la adición de E2 en ambas condiciones experimentales. HIF-1 α induce la sobre expresión y el aumento de la actividad de varias isoformas de proteínas glucolíticas que difieren de las que se encuentran en las células no malignas, incluidos los transportadores (GLUT1, GLUT3) y las enzimas (HKI, HKII, PFK-L, PFKFB-3, ALDO- A, ALDO-C, PGK1, ENO- α , PYK-M2, LDH-A,) (Rodríguez-Enríquez *et al.*, 2014; 2019).

De acuerdo con lo antes mencionado, los estrógenos y los RE están involucrados en la regulación del metabolismo energético (Glucólisis, FO y generación de ATP) mediante la regulación directa o indirecta de la actividad y expresión de las enzimas involucradas en estos procesos (Chen *et al.*, 2009). El aumento del transporte de glucosa en células malignas se ha asociado con una expresión aumentada y desregulada de proteínas transportadoras de glucosa, con la sobreexpresión de GLUT1 y / o GLUT3 (Macheda *et al.*, 2005). En este trabajo GLUT1 disminuyó y GLUT 3 aumentó en las condiciones de 10 y 100 nM de E2, sin embargo, ambas proteínas no mostraron una diferencia significativa al ser comparadas con las células en condición 0 nM de E2.

Por otra parte, varias enzimas glucolíticas (HKI, HKII, PFK y LDH) tienen elementos de respuesta a los RE y estudios previos sugieren un aumento de estas tras la adición de la hormona (Imbert-Fernández *et al.*, 2014). Por el momento no hay estudios que evalúen la expresión de estas proteínas en una línea celular RE+ con suministro de E2, pero se conoce que el nivel de mRNA en esta línea celular (incubado a concentración de 10 nM de E2) aumento 3 veces para la HKII y 4 veces para la LDH-A (Cai *et al.*, 2013). Los resultados de

este trabajo atribuyen un aumento en las proteínas glucolíticas, HKI aumenta significativamente en la condición de 10 nM de E2 y HKII tiene una tendencia a aumentar pero no tiene una diferencia significativa, la proteína LDH-A aumenta de igual manera significativamente pero hasta la concentración de 100 nM.

La activación de los RE también tiene un impacto en el metabolismo mitocondrial. En 2015 Liao y *et al.*, 2015 mencionan que el nivel de mRNA de la COX-IV aumenta 1.3 veces. Contradictoriamente, en 2012 O'Mahony *et al.*, 2014 reporta una disminución del 50% de la función mitocondrial. Los resultados de este trabajo muestran que las proteínas mitocondriales (ND1, COX-IV y ATP asa) disminuyen 10- 30% sin ser significativa la diferencia. Esto se puede atribuir a un efecto indirecto de los RE al estimular una sobreexpresión de HIF-1 α , ya que este factor transcripcional es capaz de modificar la función mitocondrial (Fukuda *et al.*, 2007) en células de cáncer de pulmón A549 al disminuir los niveles de la proteína COX-VI (Revisado en Rodríguez-Enríquez *et al.*, 2019)

Modificación del metabolismo energético tumoral mediada por el estrógeno

Como ya se mencionó el E2 y la activación de los RE están involucrados en la regulación del metabolismo energético. En presencia de estrógenos, la tasa de consumo de glucosa y producción de lactato a través de la glucólisis puede aumentar alrededor de 2 veces a concentraciones de 10 nM de E2 de 3-6 horas (Furman *et al.*, 1992; Imbert-Fernández *et al.*, 2014). Por otra parte, esta hormona aumenta significativamente el consumo de glucosa 0.36 veces y glutamina 0.5 veces, a concentraciones de E2 500 nM a 36 horas de exposición (Forbes *et al.*, 2006). En comparación con los estudios previos, este trabajo cuantificó la velocidad de producción de lactato en presencia de 2-desoxiglucosa. Aquí observamos que la glucólisis tiene un aumento del 0.5 veces en condiciones desde 10 nM a 100 nM de E2 a 7 días de exposición. Por otra parte, el consumo total de oxígeno aumenta 0.2 veces a 10 nM de E2 durante 24 horas en las líneas celulares MCF7 y T47D (Radde *et al.*, 2016). En las líneas celulares SH-SY5Y, A549 y MCF-7 a mayor concentración de E2 (100 nM) y a tiempos de exposición más cortos (3, 6 y 24 horas) el consumo de oxígeno incrementa 2.4 veces (Huss *et al.*, 2004). De manera contraria, a tiempos inmediatos (15 minutos) la concentración de citrato disminuye 50% en MCF-7 con concentraciones de E2 bajas (10 nM) (O'Mahony *et*

al., 2012). En cambio, los experimentos que realizamos en ambas concentraciones (10 y 100 nM) no presentaron cambio alguno en el flujo de FO.

Con el análisis de los flujos se determinó que la dependencia energética es 50% glucólisis y 50% FO al suministrar el E2 (10-100 nM). Previamente, en condiciones de normoxia el aporte energético era suministrado principalmente por la FO (FO=75% glucólisis=25%) atribuyendo esta reprogramación metabólica a la activación de los RE, fenómeno frecuente en células cancerígenas (Hanahan & Weinberg, 2011).

Conclusión

El suministro de E2 en una línea celular Ca Ma RE+ como es el caso de MCF-7 promueve la proliferación. Para potenciar este crecimiento el E2 aumenta la expresión de factores transcripcionales asociadas a la regulación del metabolismo energético. Como consecuencia, aumentan el contenido de proteína de las proteínas glucolíticas mientras que las proteínas mitocondriales se mantienen constantes. Esto repercute en un aumento en la glucólisis; y dado que la fosforilación oxidativa no se ve afectada, ocurre una redistribución energética donde ambas vías aportan el mismo porcentaje de ATP (Figura 10). La información obtenida de este proyecto servirá para proponer nuevas estrategias terapéuticas dirigidas a este subtipo de Ca Ma.

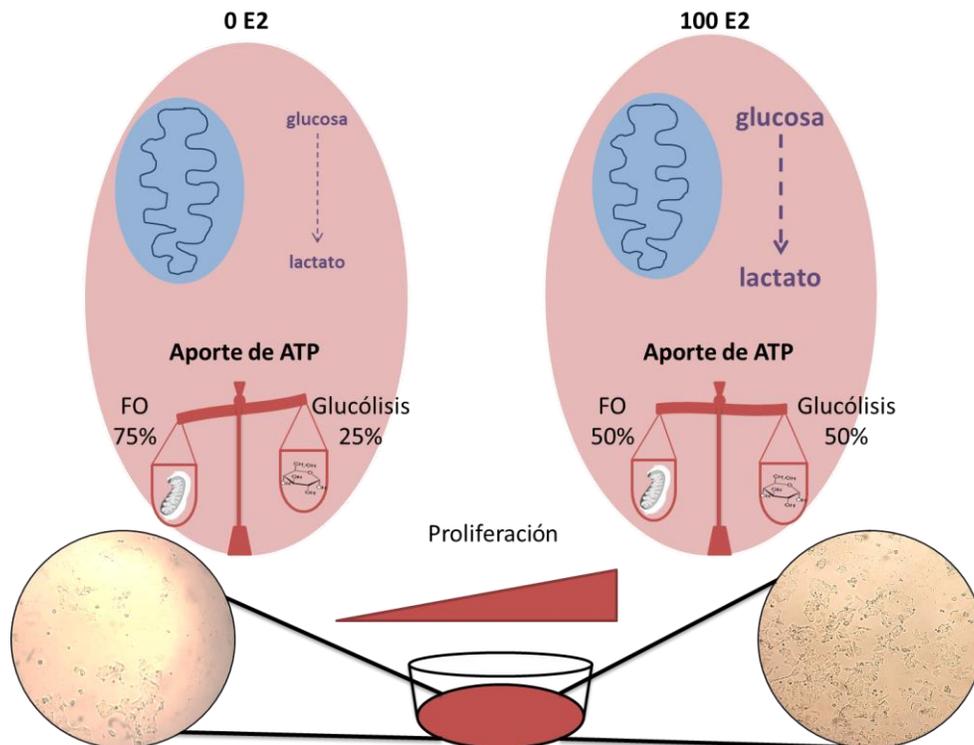


Figura 10. Esquema del efecto del E2 sobre la proliferación y el metabolismo energético (glucólisis y FO). Abreviaturas: E2 (estrógeno) y FO (fosforilación oxidativa)

Bibliografía.

- Aiello EJ, Boudreau DM, Chubak J, Yu O, Fujii M, Chestnut J, Buist DS. Patient-reported discontinuation of endocrine therapy and related adverse effects among women with early-stage breast cancer. *Journal of Oncology Practice*. 2012;8(6):149-57.
- Bland Ki, Edward M. *IA MAMA*. 3era edición. Buenos Aires, Argentina: Médica Panamericana S.A. 2007; 400-425.
- Börjesson AE, Lagerquist MK, Windahl SH, Ohlsson C. The role of estrogen receptor α in the regulation of bone and growth plate cartilage. *Cell Mol Life Sci*. 2013; 4023-37.
- Briand P, Lykkesfeldt AE. Effect of estrogen and antiestrogen on the human breast cancer cell line MCF-7 adapted to growth at low serum concentration. *Cancer Res*. 1984; 44(3):1114-9.
- Bryant J, Fisher B, Dignam J. Duration of adjuvant tamoxifen therapy. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 2001; (30):56-61.
- Buteau-Lozano H, Ancelin M, Lardeux B, Milanini J, Perrot-Appianat M. Transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor by estradiol and tamoxifen in breast cancer cells: a complex interplay between estrogen receptors alpha and beta. *Cancer Res*. 2002; 1;62(17):4977-84.
- Butler WB, Kelsey WH, Goran N. Effects of serum and insulin on the sensitivity of the human breast cancer cell line MCF-7 to estrogen and antiestrogens. *Cancer Res*. 1981; 41(1):82-8.
- Cai Q, Lin T, Kamarajugadda S, Lu J. Regulation of glycolysis and the Warburg effect by estrogen-related receptors. *Oncogene*. 2013; 32(16):2079-86.
- Carroll JS. Mechanisms of estrogen receptor (ER) gene regulation in breast cancer. *Eur J Endocrinol*. 2016; 175(1):41-9.
- Chambliss KL, Yuhanna ES, Anderson RG, Mendelsohn YO, Shaul PW 2002 ER β tiene acción no genómica en caveolas. *Mol Endocrinol* 2016; 938-946.
- Chang M. Tamoxifen resistance in breast cancer. *Biomol Ther (Seoul)*. 2012; 20(3):256-67.6-67.
- Chen JQ, Brown TR, Russo J. Regulation of energy metabolism pathways by estrogens and estrogenic chemicals and potential implications in obesity associated with increased exposure to endocrine disruptors. *Biochim Biophys Acta*. 2009; 1793(7):1128-43.
- Dontu G, El-Ashry D, Wicha MS. Breast cancer, stem/progenitor cells and the estrogen receptor. *Trends Endocrinol Metab*. 2004; 15(5):193-7.
- Drabovich AP, Pavlou MP, Schiza C, Diamandis EP. Dynamics of Protein Expression Reveals Primary Targets and Secondary Messengers of Estrogen Receptor Alpha Signaling in MCF-7 Breast Cancer Cells. *Mol Cell Proteomics*. 2016; 15(6):2093-107.

Fernández-Santander A., Tejerina A, Gómez-Gallego F, Santiago C y Bandrés F. Aspectos farmacogenéticos en el tratamiento del cáncer de mama con Tamoxifeno.España. *Sociedad española de Oncología Médica*. 2007.

Forbes NS, Meadows AL, Clark DS, Blanch HW. Estradiol stimulates the biosynthetic pathways of breast cancer cells: detection by metabolic flux analysis. *Metab Eng*. 2006; 8(6):639-52

Fukuda R, Zhang H, Kim JW, Shimoda L, Dang CV, Semenza GL. HIF-1 regulates cytochrome oxidase subunits to optimize efficiency of respiration in hypoxic cells. *Cell*. 2007; 129(1):111-22.

Furman E, Rushkin E, Margalit R, Bendel P, Degani H. Tamoxifeno indujo cambios en el cáncer de mama humano MCF7: estudios in vitro e in vivo utilizando espectroscopía de resonancia magnética nuclear e imágenes.*J Esteroides Biochem Mol Biol*.1992; 43:189-195.

Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011; 144(5):646-74.

Hsieh CC, Trichopoulos D, Katsouyanni K, Yuasa S. Age at menarche, age at menopause, height and obesity as risk factors for breast cancer: associations and interactions in an international case-control study. *Int J Cancer*. 1990; 15;46(5):796-800.

Huss JM, Torra IP, Staels B, Giguère V, Kelly DP. Estrogen-related receptor alpha directs peroxisome proliferator-activated receptor alpha signaling in the transcriptional control of energy metabolism in cardiac and skeletal muscle. *Mol Cell Biol*. 2004; 24(20):9079-91.

Imbert-Fernandez Y, Clem BF, O'Neal J, Kerr DA, Spaulding R, Lanceta L, Clem AL, Telang S, Chesney J. Estradiol stimulates glucose metabolism via 6-phosphofructo-2-kinase (PFKFB3). *J BiolChem*. 2014; 28;289(13):9440-8.

Instituto Nacional de Estadística y Geografía [INEGI]. Estadísticas Históricas de México 2009. Disponible en <http://www.inegi.org.mx/saladeprensa/aproposito/2015/mama0.pdf>. Consultado el 18 de agosto de 2017

Kelsey JL, MD de Gammon, John EM. Factores reproductivos y cáncer de mama. *Epidemiol Rev*. 1993; 15:36–47.

Klinge CM. Estrogen receptor interaction with estrogen response elements. *Nucleic Acids Res*. 2001; 15; 29(14):2905-19.

Klockars, A. J.; Hancock, G. R. Scheffé's More Powerful F Protected Post Hoc Procedure. *J. Educ. Behav. Stat*. 2000; 25:13–19.

Krzywinski, M.; Altman, N. Points of significance: Analysis of variance and blocking. *Nat. Methods*. 2014; 11:699–700.

Leung E, Kim J,Askarian-AmiriM, FinlayG, y Baguley B.EvidencefortheExistenceof Triple-NegativeVariants in the MCF-7. BreastCancer Cell Population.*BioMedResearch International*. 2014.

Levin ER. Integration of the extranuclear and nuclear actions of estrogen. *Mol Endocrinol*. 2005; 19(8):1951-9.

Liao TL, Tzeng CR, Yu CL, Wang YP, Kao SH. Estrogen receptor- β in mitochondria: implications for mitochondrial bioenergetics and tumorigenesis. *Ann N Y Acad Sci.* 2015; 1350:52-60.

Macheda ML, Rogers S, Best JD. Molecular and cellular regulation of glucose transporter (GLUT) proteins in cancer. *J Cell Physiol.* 2005; 202(3):654-62.

Macheda ML, Rogers S, Best JD. Molecular and cellular regulation of glucose transporter (GLUT) proteins in cancer. *J Cell Physiol.* 2005; 202(3):654-62.

Marín-Hernández A, Gallardo-Pérez JC, Ralph SJ. HIF-1 Modulates Energy Metabolism in Cancer Cells by inducing Over- Expression of Specific Glycology isoforms. *Mini Rev Med Chem.* 2009; 9:1084-1101.

Marín-Hernández A, Gallardo-Pérez JC, Rodríguez-Enríquez S. Modeling cancer glycolysis. *Biochim Biophys Acta.* 2011; 1807:755-767.

McAtter J, Davis J. Basic cell culture technique and the maintenance of cell lines. *In Basic Cell Culture. A practical approach.* Ed.; Davis, J. M., Ed.; IRL Press at Oxford University Press: New York, 1994; 93-147.

Migliaccio A, Di Domenico M, Castoria G, de Falco A, Bontempo P, Nola E, Auricchio F. Tyrosine kinase/p21ras/MAP-kinase pathway activation by estradiol-receptor complex in MCF-7 cells. *EMBO J.* 1996; 15;15(6):1292-300.

Moreno-Sánchez R, Marín-Hernández A, Saavedra E, Pardo JP, Ralph SJ, lessons to understand cancer energy metabolism. *Int J Biochem Cell Biol.* 2014; 50:10-23.

Moreno-Sánchez R, Rodríguez-Enríquez S, Marín-Hernández A, Saavedra E. Energy metabolism in tumor cells. *FEBS J.* 2007; 274(6):1393-418.

Moreno-Sánchez R, Saavedra E, Gallardo-Pérez JC, Rumjanek FD, Rodríguez-Enríquez S. Understanding the cancer cell phenotype beyond the limitations of current omics analyses. *FEBS J.* 2016; 283(1):54-73.

Noriega-Reyes. Correguladores del Receptor de Estrógenos y su Implicación en el Cáncer Mamario. *Cancerología.* 2008; 3: 30-37.

O'Mahony F, Razandi M, Pedram A, Harvey BJ, Levin ER. Estrogen modulates metabolic pathway adaptation to available glucose in breast cancer cells. *Mol Endocrinol.* 2012; 26(12):2058-70.

Organización Mundial de la Salud [OMS]. Cáncer de mama: prevención y control. Factores de riesgo del cáncer de mama. 2016(a). Disponible en <http://www.who.int/topics/cancer/breastcancer/es/index2.htm>. Consultado el 18 de agosto de 2017.

Pacheco-Velázquez SC, Robledo-Cadena DX, Hernández-Reséndiz I, Gallardo-Pérez JC, Moreno-Sánchez R, Rodríguez-Enríquez S. Energy Metabolism Drugs Block Triple Negative Breast Metastatic Cancer Cell Phenotype. *Mol Pharm.* 2018; 15(6):2151-2164.

Pérez-Sánchez VM, Vela-Chávez TA, Mora-Tiscareño MA. Diagnóstico Histopatológico y Factores Pronóstico en Cáncer Infiltrante de Glándula Mamaria. *Cancerología*. 2008; 3: 7-17.

Radde BN, Ivanova MM, Mai HX, Alizadeh-Rad N, Piell K, Van Hoose P, Cole MP, Muluhngwi P, Kalbfleisch TS, Rouchka EC, Hill BG, Klinge CM. Nuclear respiratory factor-1 and bioenergetics in tamoxifen-resistant breast cancer cells. *Exp Cell Res*. 2016; 347(1):222-31.

Razandi M, Pedram A, Levin ER. Plasma membrane estrogen receptors signal to antiapoptosis in breast cancer. *Mol Endocrinol*. 2000; 14(9):1434-47.

Rodríguez-Enríquez S, Gallardo-Pérez JC, Hernández-Reséndiz I, Marín-Hernández A, Pacheco-Velázquez SC, López-Ramírez SY, Rumjanek FD, Moreno-Sánchez R. Canonical and new generation anticancer drugs also target energy metabolism. *Arch Toxicol*. 2014; 88(7):1327-50.

Rodríguez-Enríquez S, Marín-Hernández Á, Gallardo-Pérez JC, Pacheco-Velázquez SC, Belmont-Díaz JA, Robledo-Cadena DX, Vargas-Navarro JL, Corona de la Peña NA, Saavedra E, Moreno-Sánchez R. Transcriptional Regulation of Energy Metabolism in Cancer Cells. *Cells*. 2019; 9;8(10).

Rodríguez-Enríquez S, Torres-Márquez ME, Moreno-Sánchez R. Substrate oxidation and ATP supply in AS-30D hepatoma cells. *Arch Biochem Biophys*. 2000; 1;375(1):21-30.

Rodríguez-Enríquez S, Carreño-Fuentes L, Gallardo-Pérez J, Saavedra E, Quezada H, Vega A, Marín-Hernández A, Olín-Sandolval V, Torres-Márquez M & Moreno-Sánchez, R. Oxidative phosphorylation is impaired by prolonged hypoxia in breast and possibly in cervix carcinoma. *The international journal of biochemistry and cell biology*, 2010; 42:1744-1751

Rosner B, Colditz GA, Willett WC. Factores de riesgo reproductivo en un estudio prospectivo de cáncer de seno: el Estudio de Salud de Enfermeras. *J Epidemiol*. 1994; 139:819–835.

Sastre-Serra J, Nadal-Serrano M, Pons DG, Roca P, Oliver J. Mitochondrial dynamics is affected by 17 β -estradiol in the MCF-7 breast cancer cell line. Effects on fusion and fission related genes. *Int J Biochem Cell Biol*. 2012; 44(11):1901-5.

The Global Cancer Observatory [GLOBOCAN]. 2018. Disponible en <https://gco.iarc.fr/>. Consultado el 19 de Agosto de 2017.

Thomas HV, Reeves GK, Key TJ. Endogenous estrogen and postmenopausal breast cancer: a quantitative review. *Cancer Causes Control*. 1997; 8(6):922-928.

Valle A, Soto I. Metabolismo energético y cáncer. *Vertientes: Revista Especializada en Ciencias de la Salud*. 2014;17(2): 108-113. Disponible en: <http://www.mediagraphic.com/pdfs/vertientes/vre-2014/vre142f.pdf>.

Wolff AC, Hammond MEH, Allison KH, Harvey BE, Mangu PB, Bartlett JMS, Bilous M, Ellis IO, Fitzgibbons P, Hanna W, Jenkins RB, Press MF, Spears PA, Vance GH, Viale G, McShane LM, Dowsett M. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Focused Update. *J Clin Oncol*. 2018;10;36(20):2105-2122.

Yang J, AlTahan A, Jones DT, Buffa FM, Bridges E, Interiano RB, Qu C, Vogt N, Li JL, Baban D, Ragoussis J, Nicholson R, Davidoff AM, Harris AL. Estrogen receptor- α directly regulates the hypoxia-inducible factor 1 pathway associated with antiestrogen response in breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015; 8;112(49):15172-7.

Yaşar P, Ayaz G, User SD, Güpür G, Muyan M. Molecular mechanism of estrogen-estrogen receptor signaling. *Reprod Med Biol*. 2016; 5:16(1):4-20.

Yu J, Astrinidis A, Howard S, Henske EP. Estradiol and tamoxifen stimulate LAM-associated angiomyolipoma cell growth and activate both genomic and nongenomic signaling pathways. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2004;286(4):L694-700.

Zhao Y, Zhao C, Lu J, Wu J, Li C, Hu Z, Tian W, Yang L, Xiang J, Zhou H, Deng Z, Huang J, Hong K. Sesterterpene MHO7 suppresses breast cancer cells as a novel estrogen receptor degrader. *Pharmacol Res*. 2019; 5:104294.

Zu XL Guppy M. Cancer metabolism: facts, fantasy, and fiction. *BiochemBiophys Res Commun*. 2004; 13:459-465.