

97



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

EFFECTOS DEL ESTRADIOL Y DE UN ANTIESTROGENO
PURO EN LA PROLIFERACION DE LINEAS CELULARES
DE CANCER CERVICO UTERINO

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A
PAOLA MAYCOTTE GONZALEZ



MEXICO, D.F.



EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA

2002

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL


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

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

Jurado asignado:

Presidente	Prof. Rogelio Rodríguez Sotres
Vocal	Profa. Raquel Ortega Muñoz
Secretario	Dr. Alfonso Dueñas González
1er. Suplente	Prof. Elpidio García Ramírez
2º. Suplente	Profa. Ma. Elena Ibarra Rubio

Sitio donde se desarrolló el tema: Instituto Nacional de Cancerología
División de Investigación Básica



Asesor del tema
Dr. Alfonso Dueñas González



Suplente
Paola Marcolte González

A mi mamá, como un pequeño reconocimiento a todo su esfuerzo; con todo mi agradecimiento por todo el apoyo y cariño que he recibido durante cada día de mi vida.

A mi Tita† y a mi Abue†, que siempre tendrán un lugar muy importante en mi corazón.

A mis tíos Chela y Armando†, mis segundos padres.

A mi osito, por darme todo lo mejor que tengo.

A Gigio, Poncho y David, por una amistad que espero saber conservar siempre.

A todos mis maestros, en especial al Q.F.B. Raúl Garza, al Dr. Vicente Talanquer, a la Dra. Josefina de Gyves y al Dr. Fernando Montiel; por enseñarme a querer mi profesión y regalarme un poquito de sus conocimientos.

A la División de Investigación Básica del INCAN. Gracias Alfonso, Blanquita, Rafa, Paty y Enrique.

A la Universidad Nacional Autónoma de México.

ÍNDICE

Abreviaturas y Definiciones	1
Resumen	3
Introducción	4
Antecedentes	
Hormonas Esteroides	7
Cáncer Cérvico Uterino e Infección por el Virus del Papiloma Humano	8
Características Estructurales y Funcionales del Receptor de Estrógenos	11
Receptores de Estrógenos y Cáncer de Glándula Mamaria	15
Receptores de Estrógenos y Cáncer Cérvico Uterino	17
Objetivos	20
Hipótesis	20
Materiales y Métodos	21
Resultados	
Efecto del Estradiol sobre la proliferación de las líneas celulares de cáncer cérvico uterino	25
Efecto del ICI 182780 sobre la proliferación de las líneas celulares	28
Discusión	33
Conclusiones	38
Referencias	39

ABREVIATURAS Y DEFINICIONES

ADN	Ácido desoxirribonucleico.
AF-1, AF-2, AF-2a	Regiones en los receptores nucleares con función de activación.
ARN	Ácido ribonucleico.
bcl-2	Oncogén que codifica una proteína enlazada a membrana que normalmente actúa para inhibir la apoptosis en estos tejidos.
c-erb B2	Oncogén que dirige la formación de un receptor para EGF alterado.
c-fos y c-jun	Familia de oncogenes que codifican para proteínas reguladoras de la transcripción.
CMH	Complejo Mayor de Histocompatibilidad.
c-myc	Oncogén involucrado en la promoción del avance del ciclo celular.
DEPC	Dietilpirocarbonato.
DMEM	Medio Eagle modificado de Dulbecco (Dulbecco's Modified Eagle Medium).
E2	Gen del VPH que codifica para un represor de E6 y E7.
E6, E7	Genes del VPH que codifican para dos onco-proteínas del mismo nombre.
EDTA	Ácido etilendiamino tetraacético.
EGF	Factor de crecimiento epidérmico (Epidermal Growth Factor).
ELISA	Ensayo inmunoenzimático (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay).
ERE	Elementos de Respuesta a Esteroides.
hsp	Proteínas de choque térmico
hTERT	Subunidad catalítica de la telomerasa humana.
IGF-1	Factor de crecimiento similar a insulina 1 (Insulin-Like Growth Factor 1).
IGF-1R	Receptor del factor de crecimiento similar a insulina 1 (Insulin-Like Growth Factor 1 Receptor).
mdr	Resistencia a múltiples fármacos (Multi Drug Resistance).
p16, p21, p27	Proteínas reguladoras del ciclo celular.
p53	Gen que codifica por una proteína involucrada en la regulación del ciclo celular y en la apoptosis.
PBS	Amortiguador salino de fosfatos (Phosphate Buffer Saline).
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction).
Rb	Gen supresor de tumores cuyas mutaciones provocan susceptibilidad al retinoblastoma y que codifica para

	una proteína del mismo nombre involucrada en la regulación del ciclo celular.
RE	Receptor de Estrógenos.
RG	Receptores de Glucocorticoides.
RP	Receptores de Progesterona.
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction).
SERMs	Moduladores selectivos del receptor de estrógenos (Selective Estrogen Receptor Modulators).
TGF- α , TGF- β	Factor de crecimiento de tumores α y β (Tumor Growth Factor α , β).
URR	Región regulatoria corriente arriba (Upstream Regulatory Region).
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular (Vascular Endothelial Growth Factor).
VPH	Virus del Papiloma Humano.

RESUMEN

El cáncer cervicouterino es la neoplasia más frecuente en la población femenina y la primera causa de muerte por cáncer en la misma.

Las células del cérvix uterino normal responden a estímulos de las hormonas esteroideas para su diferenciación y crecimiento. El efecto de estas hormonas está mediado por receptores específicos que forman un complejo para activar la transcripción de uno o varios genes. A pesar de muchos estudios sobre el efecto de las hormonas esteroideas sobre el desarrollo y progresión del cáncer cervical, su papel no está claramente establecido.

En este trabajo se estudió la presencia del receptor estrogénico en las líneas celulares de cáncer cérvico uterino SiHa, CaSki y C33 así como la respuesta proliferativa de estas líneas al ser tratadas con estradiol y el antiestrógeno puro ICI 182 780.

El estradiol no indujo proliferación en ninguna de las tres líneas celulares a concentraciones de 10^{-9} y 10^{-7} M a pesar de que la línea CaSki resultó ser RE (+). El ICI 182 780 provocó una disminución significativa en la proliferación de las tres líneas celulares a la concentración de 10^{-4} M ($\alpha = 0.05$). No se encontró relación entre el efecto proliferativo del estradiol o su antagonista con la expresión del receptor estrogénico. Nuestros resultados sugieren que los antiestrógenos puros como el ICI 182 780 podrían ser de utilidad en el tratamiento del cáncer de cérvix.

INTRODUCCIÓN

El cáncer cervicouterino es una causa común de morbilidad y mortalidad en los países en vías de desarrollo. En la década de los 90, se registraron en la región de América Latina y el Caribe tasas elevadas de incidencia y mortalidad por cáncer cérvico uterino. Esta situación contrasta con la tendencia del padecimiento en Canadá y en Estados Unidos, en donde se presentó una reducción notable de la enfermedad y se ubicaron como los países con las tasas más bajas en el continente.

En México, el cáncer cervicouterino es uno de los principales problemas de salud pública siendo la neoplasia más frecuente en la población femenina, así como la primera causa de muerte por cáncer en la misma. La Organización Panamericana de la Salud (OPS) analizó la tendencia del cáncer cérvico uterino en México y concluyó que entre los años sesenta y noventa se registró un incremento de la mortalidad en todos los grupos de edad. Este incremento se acentúa a partir de los 50 años de edad y alcanza las tasas más altas en el grupo de mujeres mayores de 70 años (Eluf-Neto y Nascimento, 2001; Vargas *et al*, 1998; Meneses *et al*, 1994; Hinojosa y Dueñas, 2000).

En 1996, el cáncer se ubicó como la segunda causa de mortalidad general en nuestro país y concentró 11.4% de las defunciones registradas en ese año. Alrededor del 30% de todos los tumores malignos en México son carcinomas del cérvix (González *et al*, 1992) y esta enfermedad es responsable de aproximadamente el 25% de las muertes por cáncer en mujeres mexicanas (Mohar *et al*, 1997). Considerando a toda la población, el cáncer del cuello uterino ocupó el tercer lugar entre las principales neoplasias malignas responsables de las defunciones ocurridas en 1996

que, sin embargo, pasó al primer lugar en el grupo en edad productiva (15 a 69 años) pues concentró 65% de las muertes atribuidas a este padecimiento (Vargas *et al*, 1998). Esta tendencia se ha mantenido desde hace varios años resultando afectada en mayor proporción la población femenina de 40 a 60 años.

Para disminuir la mortalidad debida a esta neoplasia, se ha demostrado la efectividad de la detección temprana con la prueba de Papanicolaou. A pesar de esto, en nuestro país la tasa de mortalidad permanece sin modificaciones importantes (Hinojosa y Dueñas, 2000).

Los factores asociados al cáncer del cuello uterino son: la edad (entre 25 y 64 años), multiplicidad de compañeros sexuales, infecciones de transmisión sexual (en particular las causadas por el Virus del Papiloma Humano), nutrición deficiente en vitaminas C y D, multiparidad, uso de anticonceptivos orales, tabaquismo e inicio temprano de la vida sexual (Vargas *et al*, 1998).

La radioterapia y cirugía son las modalidades terapéuticas primarias, pero la quimioterapia cada vez está siendo más utilizada, tanto de manera definitiva, como de manera adyuvante. Desafortunadamente, en México las pacientes con carcinoma de cérvix cursan con mayor frecuencia con estadios clínicos avanzados. El tratamiento para estas etapas de la enfermedad consiste en radioterapia concomitante con quimioterapia con lo cual se logran porcentajes de supervivencia a 5 años de 15 a 70%. Para las enfermas que se presentan con enfermedad metastásica a distancia o aquellas con recurrencia o persistencia de la enfermedad, la mediana de supervivencia es de aproximadamente ocho meses (Hinojosa y Dueñas, 2000).

A pesar del esfuerzo de médicos e investigadores para mejorar los resultados del tratamiento de estas pacientes, muchas mujeres siguen sucumbiendo a esta enfermedad. Este trabajo pretende contribuir a la investigación de nuevas modalidades terapéuticas para el cáncer cervicouterino.

ANTECEDENTES

Hormonas Esteroides

El cérvix uterino normal responde a estímulos de las hormonas sexuales, por lo que existen numerosos estudios que tratan de identificar el papel de las hormonas esteroides en el proceso carcinogénico del cérvix.

Los estrógenos promueven principalmente la proliferación y el crecimiento de células específicas del cuerpo y son responsables del desarrollo de la mayoría de los caracteres sexuales secundarios de la mujer. En el plasma de la mujer sólo hay cantidades significativas de tres estrógenos: β -estradiol, estrona y estriol. El principal estrógeno secretado por los ovarios es el β -estradiol. Por otra parte, los progestágenos están implicados de forma casi exclusiva en la preparación final del útero para la gestación y de las mamas para la lactancia. El principal progestágeno es la progesterona. Por lo tanto, las hormonas esteroides, como el estradiol y la progesterona, son importantes en la regulación de algunos genes involucrados en procesos de crecimiento, proliferación, diferenciación y fisiología de las células de varios tejidos del cuerpo. Además, desde hace tiempo se sabe de su influencia en el comportamiento de neoplasias hormonodependientes como el cáncer de mama y endometrio (Guyton y Hall, 1996).

Cáncer Cérvico Uterino e Infección por el Virus del Papiloma Humano

El carcinoma de cérvix, al igual que las demás neoplasias malignas, es provocado por alteraciones genéticas que producen defectos en la proliferación, diferenciación y apoptosis (Alfaro *et al*, 2000).

Aunque el uso de anticonceptivos orales (Hildesheim *et al*, 1990; Tohan *et al*, 1991), el tabaquismo y factores dietéticos e inmunológicos tales como una disminución de la expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (Kim *et al*, 2000) podrían participar en el desarrollo del cáncer de cérvix; existen múltiples evidencias epidemiológicas y experimentales de que la infección por el virus del papiloma humano (VPH) es el agente etiológico más importante para el desarrollo de este tumor (Walboomers *et al*, 1999).

Existen aproximadamente 65 tipos descritos de VPHs, alrededor de 20 de estos VPHs se asocian con lesiones anogenitales. Estos grupos de VPHs pueden clasificarse como de "alto riesgo" y de "bajo riesgo" según si la lesión del tracto genital a la que se asocian tiene o no riesgo de progresión maligna. Los virus de "bajo riesgo" como el VPH-6 y el VPH-11 se asocian con lesiones venéreas o condiloma acuminata, las cuales raramente se convierten en malignas. En contraste, los virus de "alto riesgo" como el VPH-16 y el 18 se asocian con displasias cervicales, lesiones que tienen un alto riesgo de progresar a la malignidad. En general, los tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52 y 56 se han encontrado en casos de displasia moderada y severa, así como en carcinomas cervicales invasivos y por lo tanto, constituyen al grupo de "alto riesgo". Por lo regular, el ADN del virus se encuentra integrado al genoma del huésped cuando se encuentra

asociado a lesiones de cáncer cervical y a líneas celulares VPH(+) (Howley, 1991).

Se ha encontrado ADN del virus en más del 99% de los casos de las lesiones invasoras y se sabe que los VPH tienen oncogenes virales que codifican para dos oncoproteínas: las proteínas E6 y E7 (Walboomers *et al.*, 1999).

El ADN viral generalmente se abre en la región E1/E2 para integrarse al genoma del huésped, alterando el circuito regulatorio de transcripción de E2. El marco abierto de lectura de E2 codifica para una proteína reguladora de la transcripción, que es una proteína de unión al ADN. En los tipos de VPH 16 y 18, E2 parece actuar principalmente como un represor del promotor de los genes E6 y E7. Las proteínas de estos genes provocan la inmortalización y transformación celular. La oncoproteína E6 se une a p53, una proteína involucrada en la transición G1/S del ciclo celular, y estimula su degradación dependiente de ATP invocando al sistema ubiquitina proteasoma. Por su parte, la proteína E7 de todos los VPHs del tracto genital, es capaz de formar un complejo con Rb, el producto del gen supresor de tumores de susceptibilidad al retinoblastoma (Madrigal *et al.*, 1997; Howley, 1991).

Se ha demostrado también que las hormonas esteroideas interactúan con las infecciones por VPH a varios niveles. Los estrógenos y progestágenos aumentan la expresión de los genes virales E6 y E7 por medio de elementos de respuesta a glucocorticoides y progestágenos en el genoma del VPH en líneas celulares que lo contienen (Kim *et al.*, 2000; Khiong *et al.*, 1989).

Las hormonas esteroides también inhiben la respuesta inmune contra lesiones cervicales menores inducidas por VPH a través de una inhibición de la expresión de moléculas clase I del complejo mayor de histocompatibilidad en células de carcinoma cervical, lo cual explica que la respuesta inmune se vea disminuida contra las células infectadas con el VPH (Merideth *et al*, 2000). Bartholomew *et al* (1997), reportaron que la hidrocortisona y la progesterona disminuyen consistentemente la expresión de la molécula clase I del CMH en líneas celulares cervicales VPH(+), pero aumenta su expresión en líneas VPH(-). Esta regulación puede bloquearse con RU 38486, un antagonista de los receptores de glucocorticoides y de progesterona, indicando la importancia de los receptores como intermediarios en la disminución de la expresión de esta molécula.

Por otra parte, se ha observado que las hormonas esteroides pueden aumentar la sobrevivencia de células infectadas con el VPH y potencialmente disminuir la respuesta a la radiación, una modalidad terapéutica ampliamente utilizada para tratar el carcinoma del cérvix.

La hormona glucocorticoide sintética dexametasona aumenta la radioresistencia de células de cáncer cervical positivas para el VPH y no muestra ningún efecto en células que no presentan VPH o en células que expresan la secuencia antisentido del VPH para E6/E7. Los glucocorticoides también inhiben la apoptosis inducida por radiación en la línea de cáncer de cérvix C4-1, lo que corresponde con niveles aumentados del ARN mensajero de E6/E7 y una expresión disminuida de p53 (Merideth *et al*, 2000). Rutz *et al* (1998), reportaron también radioresistencia inducida por dexametasona en líneas celulares de cáncer cervicouterino, pero independiente de la expresión de los genes del VPH.

Características Estructurales y Funcionales del Receptor de Estrógenos

Desde hace varias décadas está demostrado que el mecanismo de acción de las hormonas esteroides está mediado por la presencia de receptores específicos para cada hormona. Éstos forman complejos receptor-ligando activos que son translocados a secuencias específicas de ADN del genoma (conocidos como elementos de respuesta a esteroides, ERE) y localizados en la región de flaqueo 5' del gen, para la activación final de la transcripción de uno o varios genes (Barrón *et al.*, 1997).

El receptor de estrógenos (RE) es una proteína nuclear altamente fosforilada en sus residuos de serina y/o tirosina que pertenece a la familia de receptores nucleares, entre los que se encuentran los específicos para progesterona (RP), glucocorticoides (RG), andrógenos, mineralocorticoides, hormonas tiroideas, vitamina D y retinol (Barrón *et al.*, 1997). El RE regula la diferenciación y mantenimiento de tejidos neurales, óseo, cardiovascular y reproductivo. Los compuestos que regulan la acción transcripcional de este receptor actualmente se utilizan para prevenir la osteoporosis y enfermedades cardiovasculares, así como agentes quimiopreventivos y terapéuticos para el cáncer de mama (Shiau *et al.*, 1998).

La familia de receptores nucleares presenta tres dominios importantes para su función: una secuencia específica en la región C-terminal, en donde se une el ligando y contiene además dos funciones de activación (AF-2 y AF-2a), una región para su unión a sitios específicos dentro del genoma (ADN) y una porción amino terminal que tiene la función de activación de la transcripción (AF-1) (Shiau *et al.*, 1998).

El receptor de estrógenos está codificado por un gen que contiene 8 exones codificantes. El dominio de unión al ligando reconoce una gran variedad de compuestos (Figura 1) como el 17- β estradiol, el estrógeno sintético no esteroidal dietilestilbestrol, y los ligandos sintéticos como el tamoxifén, el raloxifén y el ICI 182 780 (Shiau *et al*, 1998).

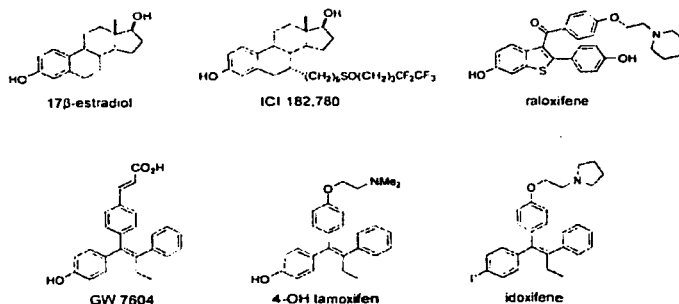


Figura 1. Estructura química de algunos ligandos del RE.

La complejidad de la respuesta observada con los estrógenos en distintos tejidos celulares se debe en parte a la existencia de dos subtipos de receptores de estrógenos, el RE α y el RE β . Aunque muestran una homología del 59% en el sitio de unión al ligando y una homología aún mayor para los aminoácidos que rodean esta región, los subtipos de receptores presentan distintas respuestas transcripcionales ante los antiestrógenos (Dudley *et al*, 2000). En el caso del RE α , algunos ligandos, como el estrógeno endógeno 17 β -estradiol y el estrógeno sintético no esteroidal dietilestilbestrol funcionan como agonistas puros; mientras otros, como el ICI 164 384 y el ICI 182 780 funcionan como antagonistas puros. Los ligandos sintéticos como el tamoxifén y el raloxifén pertenecen a un grupo

de moléculas conocidas como moduladores selectivos del RE (SERMs), que funcionan como antagonistas en tejidos específicos (Shiau *et al*, 1998). La fosforilación del receptor regula la unión del RE a estradiol en ciclos de fosforilación y defosforilación dependientes de calcio. La habilidad del RE de unirse a regiones ERE del ADN también es dependiente de la fosforilación del receptor (Lieberman, 1997).

El RE se encuentra localizado principalmente en el núcleo, pero puede localizarse en el citoplasma y transportarse al núcleo por un mecanismo dependiente de energía. El receptor sin ligando se encuentra formando un complejo oligomérico en el cual se pueden encontrar algunas otras proteínas unidas, como proteínas de choque térmico (hsp 90 y hsp 56), proteínas de translocación, cinasas, proteínas lisosomales y miembros del complejo de transcripción. La hsp 90 mantiene al receptor inactivo en ausencia del ligando y es importante para el enrollamiento de las proteínas y el transporte del receptor a través de la membrana. Además, este complejo proteínico inhibe la formación de dímeros de receptor transcripcionalmente activos. Los antagonistas también provocan la disociación del complejo, pero no permiten la activación del receptor (Barrón *et al*, 1997; Beato, 1989; Lieberman, 1997).

Un modelo de acción estrogénica aceptado actualmente (Barrón *et al*, 1997) propone que los estrógenos libres difunden pasivamente hacia el interior de la célula y son retenidos por la formación de un complejo con proteínas intracelulares específicas para esteroides. Después de formar el complejo proteínico, éste puede actuar como un activador o modulador transcripcional. Se conocen una serie de interacciones proteína-proteína entre monómeros del RE para formar homodímeros, pero los resultados sobre la importancia de la dimerización son controversiales.

Se ha demostrado (Lieberman, 1997) que el RE puede unirse al ADN sin la hormona, pero no es capaz de activar la transcripción. Gorski *et al* (1993) proponen que el RE se une al ADN en forma monomérica. Desde esta perspectiva, la unión a estrógenos no tendría influencia en la unión del receptor al ADN, pero sí induciría cambios dramáticos en su estructura, siendo el más importante la reducción en hidrofobicidad superficial del receptor, internalizando la cadena lateral de aminoácidos hidrofóbicos en el extremo COOH terminal, sitio en donde se ubica el dominio de unión al ligando.

Por otra parte, se ha aislado el dímero del RE por gradiente de centrifugación en células MCF-7, además de que se ha reportado la necesidad de dímeros del RE para una unión de alta afinidad al ADN *in vitro*. Alternativamente, se ha encontrado la unión del RE con alta afinidad como monómero, sugiriendo que la dimerización del receptor para la activación puede no ser tan importante (Lieberman, 1997). Por lo tanto, la hormona parece estar ayudando a formar una estructura transcripcionalmente activa, pero no por sí misma, sino por provocar un cambio de conformación específica de la proteína para la activación.

Otros investigadores sugieren que el RE se une a algunos genes como un monómero y a otros como dímero. En tal caso, el número de receptores presentes en la célula tendría un efecto importante en la activación de la transcripción, ya que la cantidad de monómeros y dímeros presentes en la célula provocaría una activación selectiva de los genes (Hyder *et al*, 1997).

Existe evidencia experimental que demuestra la presencia de ERE dentro de regiones promotoras de proto-oncogenes que provocarían un aumento en la transcripción de genes como *myc*, *fos*, *c-jun*, *jun-D* y *jun-B*, lo que en algunos casos se puede traducir en una respuesta proliferativa en la célula, dependiendo de factores tejido-específicos (Hyder *et al*, 1997; Barrón *et al*, 1997). La estimulación estrogénica también se ha relacionado con factores de crecimiento celulares, como el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el factor de crecimiento similar a insulina-1 (IGF-1); (DeFriend *et al*, 1994).

Receptores de Estrógenos y Cáncer de Glándula Mamaria

En la clínica, la presencia o ausencia del receptor de estrógenos se utiliza como marcador de evaluación pronóstica y como parámetro de decisión para el tratamiento con antiestrógenos de algunos tipos de cáncer dependientes de hormonas como el de mama y endometrio (Barrón *et al*, 1997). Los tumores RE (+) muestran un mejor pronóstico a corto plazo por sus características moleculares y patológicas de menor agresividad tumoral, además de que responden al tratamiento con antiestrógenos (tamoxifén). El tamoxifén es un antiestrógeno no esterooidal que actualmente se utiliza como la primera opción para el tratamiento endócrino para cáncer de mama (Dueñas-Gonzalez, 1999). En la mama, el tamoxifén inhibe competitivamente la unión del estrógeno a su receptor, afectando la expresión de genes regulados por estrógenos.

En los tumores RE (-) se ha observado sólo una respuesta del 10% al tratamiento con antiestrógenos, debido probablemente a las acciones del tamoxifén no relacionadas con el bloqueo del receptor, como son la inducción de TGF- β y la disminución de IGF-1 (Dueñas-Gonzalez 1999).

Además, el 65% de los tumores de mama son RE (+) y son dependientes de estradiol para su crecimiento. Aunque no se conoce completamente el mecanismo por el que los estrógenos regulan el crecimiento de estas células, se sabe que existe una inducción hormonal de factores de crecimiento como el TGF- α , además de que el estradiol puede regular positivamente los receptores para EGF y c-erb B2 (neu), el receptor para heregulina e induce rápidamente al gen c-myc en líneas celulares de mama RE (+) (Teixeira *et al*, 1995). DeFriend *et al* (1994), reportaron un aumento significativo y dependiente de la dosis en la eficiencia de la formación de colonias en líneas de carcinoma mamario tratadas con estradiol y una disminución significativa de la misma al tratar las células con tamoxifén y con el antiestrógeno puro ICI 182 780. Este último resultó ser más eficiente que el tamoxifén a concentraciones mayores a 10 nM. Además, Howell *et al* (1996), administraron ICI 182 780 a pacientes con cáncer de mama avanzado que no mostraron respuesta al tamoxifén encontrando un 69% de respuesta por lo que se propone que el ICI 182 780 puede ser un antiestrógeno de segunda línea sin efectos negativos aparentes en hígado, cerebro o tracto genital.

Por otro lado, en investigaciones recientes se reporta que los estrógenos y sus receptores regulan la transcripción de hTERT, la subunidad catalítica de la telomerasa humana. Consecuentemente, tienen un papel importante en la activación de esta enzima en células epiteliales de ovario (Misiti *et al*, 2000) y en una línea celular de cáncer de mama positiva para el receptor de estrógenos (Kyo *et al*, 1999). Esto puede resultar importante para la comprensión de la acción estrogénica en los tumores malignos, en la mayoría de los cuales se presenta actividad de esta enzima, misma que provee de un mecanismo antiapoptótico a las células neoplásicas.

Receptores de Estrógenos y Cáncer Cérvico Uterino

El significado para el pronóstico de la expresión de los receptores de estrógenos y de progesterona en el cáncer cérvico uterino es aún controversial. Lu *et al* (1999), reportaron que el adenocarcinoma cervical muestra una disminución en la expresión de los receptores de estrógenos y de progesterona, así como una alteración en la expresión de moléculas relacionadas con el ciclo celular (ciclina E, p53, p16, p21 y p27). En concordancia, Pérez-Cárdenas *et al* (resultados no publicados) encontraron que los tumores de cérvix, sin importar su tipo histológico, expresan con menor frecuencia receptor de estrógenos y de progesterona que los tejidos normales; sus datos sugieren que la positividad de los mismos, particularmente del RP se asocia a un pronóstico peor. Toki *et al* (1997), por su parte, reportan una menor expresión de RE y de RP en adenocarcinomas con desviación mínima. Sin embargo, no existen datos claros sobre cuál es el papel de la presencia de los receptores en cuanto a la respuesta que presenten al tratamiento ni al pronóstico. Fujiwara *et al* (1997), encontraron una menor frecuencia de positividad para RE en tumores poco diferenciados, pero no detectaron ninguna asociación entre la presencia de RE ni de RP y la sobrevida libre de enfermedad.

Suzuki *et al* (2000), reportan que el estado del RE en pacientes con adenocarcinoma del cérvix tratadas con radioterapia no se correlaciona con el control local a 5 años ni con la sobrevida libre de enfermedad. En cuanto al RP, reportan que la proporción de sobrevida libre de enfermedad fue significativamente más alta en los pacientes con tumores RP (+) tratados con radioterapia.

Las células de cáncer cervical responden al tratamiento con estradiol con una mayor proliferación con inducción del RP *in vivo*, y al tratamiento con tamoxifén a bajas concentraciones (10^{-9} y 10^{-11} M) con aumento en la proliferación *in vitro*. Esta última respuesta probablemente está mediada por un mecanismo distinto al evocado por la estimulación del receptor de estrógenos (Hwang *et al.*, 1992). El estradiol probablemente induzca proliferación en líneas de cáncer de cérvix por los mismos mecanismos que se han demostrado para carcinoma mamario.

Por otra parte, las hormonas esteroideas pueden también dificultar la acción de algunas de las modalidades terapéuticas utilizadas para tratar el cáncer de cérvix. Teixeira *et al.* (1995), reportaron resistencia a agentes quimioterapéuticos (adriamicina) inducida por estrógenos en líneas celulares de carcinoma mamario RE (+) a través de la regulación del oncogén bcl-2, cuya proteína suprime la apoptosis. También se ha observado que las hormonas estrogénicas tienen la capacidad de inducir la expresión de genes de resistencia a múltiples fármacos (mdr) en células del epitelio de útero de rata (Arcresi *et al.*, 1990); así como la resistencia a agentes quimioterapéuticos como la adriamicina en líneas celulares de carcinoma cervical (Biing *et al.*, 1994) y que el antiestrógeno ICI 164 384 puede revertir la resistencia a doxorubicina en líneas celulares de leucemia humana resistentes a fármacos (Hu *et al.*, 1991). Además, Huynh *et al.* (1996) demostraron que el antiestrógeno ICI 182 780 atenúa el crecimiento estimulado por IGF-1, probablemente debido a una reducción en la expresión de su receptor (IGF-1R).

El ICI 182 780 también bloquea la expresión de algunos factores de crecimiento inducidos por estradiol y tamoxifén en útero murino *in vivo*. Hyder *et al.* (1997) reportaron una disminución en la expresión de los RNAs

de c-fos y de VEGF (genes inducidos por la administración de estradiol y tamoxifén) al administrarse 30 minutos antes del estradiol o tamoxifén a dosis de 3 mg/kg.

Por lo anterior, el uso de un antiestrógeno puro para tratar de bloquear los efectos proliferativos, de resistencia al tratamiento y proangiogénicos del estradiol en el carcinoma cervical, aunado con los efectos antiproliferativos que pueda tener por sí solo, podría sentar las bases para el tratamiento de cáncer de cérvix con hormono terapia. Más adelante, éste podría servir como terapia adyuvante para aumentar la sensibilidad al tratamiento con radiación y/o agentes quimioterapéuticos. Es importante mencionar que hasta el momento no existen estudios que hayan evaluado el efecto de un antiestrógeno puro sobre el carcinoma cervical. Hwang *et al* (1992) utilizaron tamoxifén para evaluar sus efectos sobre una línea celular de cáncer de cérvix. Sin embargo, este antiestrógeno se comporta como agonista en tejido uterino.

Este trabajo pretende generar información sobre los efectos de un antiestrógeno puro sobre líneas celulares de cáncer de cérvix.

OBJETIVOS

Evaluar *in vitro*, los efectos del estradiol y el antiestrógeno puro ICI 182 780, sobre la proliferación de 3 líneas celulares de cáncer de cérvix (SiHa, CaSki y C33).

Evaluar el estado del Receptor de Estrógenos en cada una de las líneas celulares para tratar de correlacionarlo con los efectos sobre la proliferación del estradiol y del ICI 182 780.

HIPÓTESIS

Las células de cáncer cérvico uterino deben comportarse de una manera similar a las células de cáncer de mama ante el tratamiento con estradiol e ICI 182 780; por lo tanto, se pretende encontrar un aumento en la proliferación de las mismas ante el tratamiento con estradiol y una disminución de la proliferación ante el tratamiento con el antiestrógeno puro. Del mismo modo, las líneas celulares que respondan con un aumento en la proliferación ante el estradiol y con una disminución de la misma ante el ICI 182 780, deberán ser RE (+) en caso de que los efectos en la proliferación estén mediados por el Receptor de Estrógenos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sustancias químicas. El 17- β estradiol (Sigma Chemical Co., San Luis Missouri, USA) y el ICI 182780 (Tocris Cookson Inc., Ellisville Missouri, USA) se diluyeron en etanol absoluto y las soluciones se almacenaron en la oscuridad a -20°C hasta ser utilizadas.

Líneas celulares. Las líneas celulares SiHa, CaSki, C33 y MCF-7 se cultivaron en DMEM con suero fetal bovino al 10% en incubadoras con atmósfera húmeda a 37°C y 5% de CO₂.

Tratamiento de las líneas celulares. Las células se cultivaron de manera rutinaria y una vez confluentes se despegaron con tripsina al 0.25% en PBS-EDTA 1 mM, y se contaron manualmente con la ayuda de un hemocitómetro. Se sembraron de 500 a 1,000 células dependiendo de la línea celular en placas de 96 pozos, grado cultivo celular de fondo plano y a las 24 horas de sembradas se trataron con las siguientes diluciones de los fármacos en DMEM con 10% de suero fetal bovino:

- Estradiol 10⁻⁹ M y 10⁻⁷ M
- ICI 182 780 10⁻⁷ M y 10⁻⁴ M
- Etanol absoluto como control

Se incubaron en atmósfera húmeda a 37°C, con 5% de CO₂ por 120 horas. A las 72 horas se reemplazó el medio con medio fresco (conteniendo también las drogas). La cuantificación de la proliferación celular se hizo por ensayo XTT a las 120 horas.

Ensayo XTT, colorimétrico, no radiactivo, para la cuantificación de proliferación celular (Roche Molecular Diagnostics, Basel, Suiza). Después del período de incubación, se añadió al medio, el reactivo XTT a una concentración final de 0.3 mg/ml y se incubó por 4 horas en atmósfera húmeda, a 37°C con 5% CO₂. La absorbancia de las muestras se leyó en un lector de ELISA a 492 nm, con una λ de referencia de 690 nm.

El ensayo se basa en la ruptura de una sal de tetrazolio (XTT) para convertirse en formazán, un colorante naranja, por las células metabólicamente activas. El formazán es soluble en soluciones acuosas, su aumento muestra una relación directamente proporcional al aumento de deshidrogenasas mitocondriales en la muestra y, por lo tanto, al aumento de células viables. Puede cuantificarse espectrofotométricamente ya que muestra un máximo de absorbancia entre 450 y 500 nm (Figura 2).

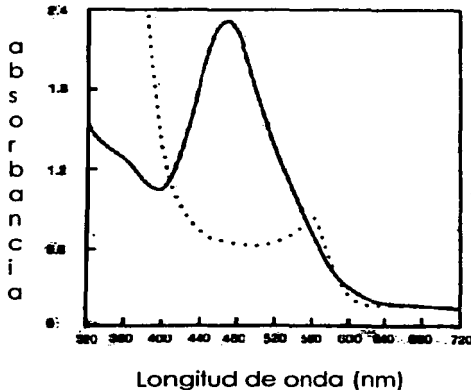


Figura 2. Comparación del espectro UV del XTT (línea punteada) y el formazán, formado por la actividad de las deshidrogenasas mitocondriales.

Extracción de ARN. Se utilizó el reactivo TRIZOL (Gibco BRL, Invitrogen Corp. Carlsbad, California) para el aislamiento de ARN total de células. El reactivo es una solución monofásica de fenol y guanidin isotiocianato. Se utilizó 1 ml de reactivo Trizol por cada caja de 25 cm² con una monocapa confluyente y se rasparon las células con un gendarme. El homogenado se guardó por 5 minutos a temperatura ambiente para permitir la disociación completa de los complejos de nucleoproteínas. El ADN se extrajo con 0.2 ml de cloroformo, se agitó y se dejó por 3 min a temperatura ambiente. Se centrifugó a 10,000 rpm por 15 min. La fase acuosa se transfirió a otro tubo, se adicionó isopropanol para precipitar el ARN. Las muestras se dejaron por 30 min en hielo. Se centrifugó a 10,000 rpm por 15 min. Se tiró el sobrenadante y el ARN se lavó con etanol al 75%. Se centrifugó a 12,000 rpm por 5 min. El botón de ARN se dejó secar y se resuspendió en agua tratada con DEPC.

RT-PCR. Se utilizó 1 µg de RNA celular total para cada reacción de transcripción reversa en un volumen final de 100 µL. Las condiciones utilizadas fueron:

Transcripción reversa: 15 min, 42°C

Desnaturalización: 5 min, 99°C

Enfriamiento: 5 min, 5°C

PCR. Posteriormente, se utilizaron los 100 µL del producto de la reacción para PCR. Se emplearon los oligonucleótidos (5'-GCACCCTGAAGTCTCTGGAA-3', 5'-TGGCTAAAGTGGTGATGAT-3') que amplifican un producto de 470 pares de bases que corresponde a los exones 7 y 8 del gen del RE. Las condiciones de amplificación han sido descritas previamente (Ferguson et al, 1995) las cuales son como sigue:

Paso inicial 105 seg. . 95°C, 1 ciclo

Desnaturalización 30 seg. . 95°C

Alineación-extensión 30 seg. . 55°C

} 35 ciclos

Paso final 7 min, 72°C

Los productos de la PCR se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% con bromuro de etidio. La visualización se realizó por exposición a luz ultravioleta.

Análisis Estadístico. Las diferencias entre las medias de cada uno de los grupos se estableció utilizando una prueba de t con un nivel de significancia del 5%.

RESULTADOS**Efecto del Estradiol sobre la proliferación de las líneas celulares de cáncer cérvico uterino**

Se utilizaron dos concentraciones distintas de estradiol: 10^{-9} y 10^{-7} M para evaluar su efecto sobre la proliferación de las líneas celulares, utilizando el ensayo XTT para su cuantificación. Los resultados se muestran en las figuras 3 a la 6.

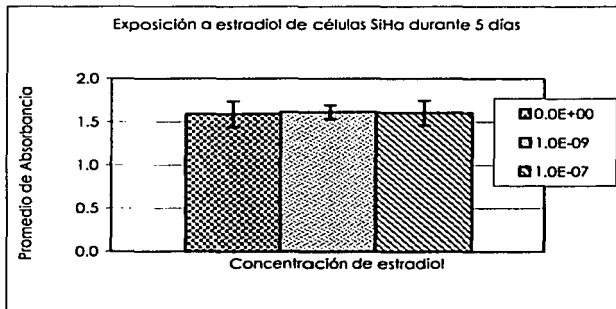


Figura 3. Efecto del estradiol sobre la proliferación de la línea celular SiHa (estradiol 10^{-9} M  , 10^{-7} M  , control ).

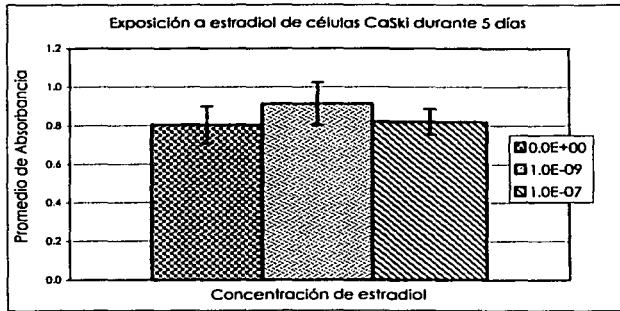


Figura 4. Efecto del estradiol sobre la proliferación de la línea celular CaSki (estradiol 10^{-9} M  , 10^{-7} M  , control ).

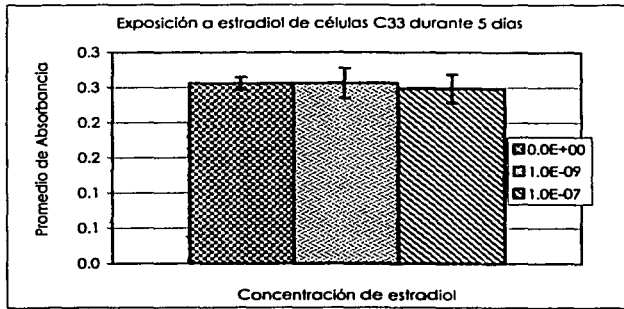


Figura 5. Efecto del estradiol sobre la proliferación de la línea celular C33 (estradiol 10^{-9} M  , 10^{-7} M  , control ).

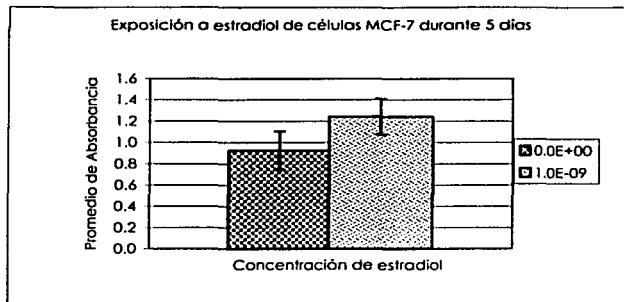


Figura 6. Efecto del estradiol sobre la proliferación de la línea celular MCF-7 (estradiol 10^{-9} M , control ).

Ninguna de las líneas celulares de cáncer cérvico uterino muestra un efecto proliferativo estadísticamente significativo con las dos concentraciones de estradiol utilizadas (10^{-9} M y 10^{-7} M); (Cuadro 1).

La línea celular SiHa no mostró un aumento de la proliferación estadísticamente significativo con respecto al control en ninguna de las dos concentraciones utilizadas (101.5% a la concentración 10^{-9} M y 100.9% a la concentración 10^{-7} M). Por su parte, la línea celular CaSki respondió al tratamiento con estradiol con un aumento en la proliferación de 113.5% y de 102.0% con respecto al control en las concentraciones de estradiol 10^{-9} M y 10^{-7} M respectivamente; ninguno de los dos porcentajes resultó estadísticamente significativo. Por último, la línea celular C33 mostró un aumento en la proliferación del 100.2% y del 97.1% al tratarse con estradiol 10^{-9} M y 10^{-7} M respectivamente; ninguno de los dos estadísticamente significativo. La mayor proliferación en las tres líneas se logró a la concentración de estradiol 10^{-9} M.

La línea celular MCF-7 se utilizó como control positivo, ya que su estimulación por el estradiol ya había sido reportada por De Friend *et al* (1994). El estradiol mostró un efecto proliferativo estadísticamente significativo ($\alpha = 0.05$) sobre esta línea celular a una concentración de 10^{-9} M, aumentando la proliferación de las células tratada con respecto al control en un 134.5%.

Efecto del ICI 182 780 sobre la proliferación de las líneas celulares

Se probaron dos concentraciones del antiestrógeno ICI 182 780: 10^{-7} y 10^{-4} M para evaluar su efecto sobre la proliferación de las líneas celulares, utilizando el ensayo XTT para su cuantificación. Los resultados se muestran en las figuras 7 a la 10.

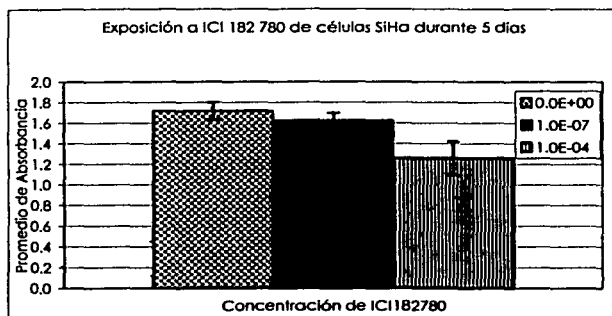


Figura 7. Efecto del ICI 182 780 sobre la proliferación de la línea celular SiHa (ICI 182 780 10^{-7} M  , 10^{-4} M  , control ).

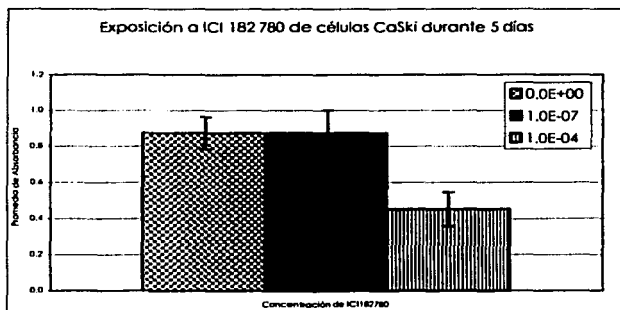


Figura 8. Efecto del ICI 182 780 sobre la proliferación de la línea celular CaSki (ICI 182 780 $10^{-7}M$ [checkered], $10^{-4}M$ [vertical lines], control [checkered]).

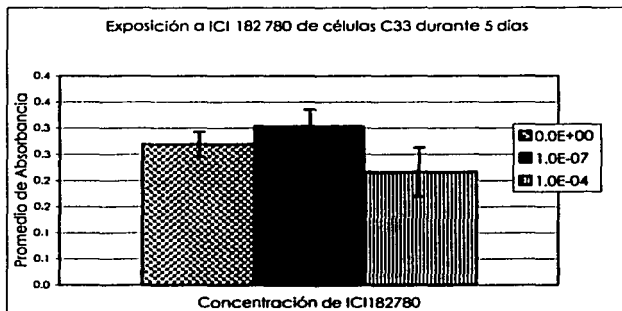


Figura 9. Efecto del ICI 182 780 sobre la proliferación de la línea celular C33 (ICI 182 780 $10^{-7}M$ [checkered], $10^{-4}M$ [vertical lines], control [checkered]).

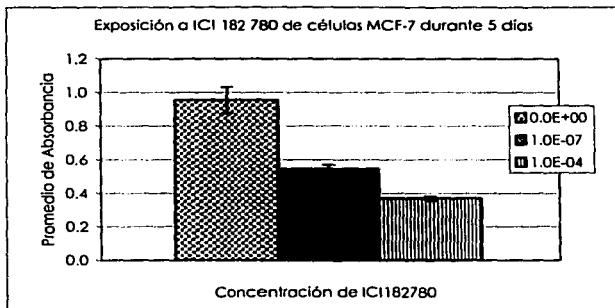


Figura 10. Efecto del ICI 182 780 sobre la proliferación de la línea celular MCF-7 (ICI 182 780 10^{-7} M , 10^{-4} M , control).

Al tratar a las líneas celulares de cáncer de cérvix con ICI 182 780, la línea celular SiHa mostró una disminución en la proliferación del 93.4% con respecto al control; la línea celular CaSki mostró una disminución del 89.8% con respecto al control y la línea celular C33 mostró un aumento en la proliferación del 107.5% con respecto al control, ninguna de las tres estadísticamente significativas con α de 0.05 (Cuadro 1).

Las líneas celulares de cáncer de cérvix SiHa, CaSki y C33 respondieron con una menor proliferación estadísticamente significativa (α de 0.05) sólo al tratamiento con ICI 182 780 10^{-4} M. Las disminuciones en la proliferación observadas con respecto al control a esta concentración de ICI 182 780 fueron: SiHa 73.3%, CaSki 51.7%, C33 80.4%. La línea celular CaSki RE (+) mostró la menor proliferación con respecto al control a ambas concentraciones (Cuadro 1).

La línea celular de cáncer de mama MCF-7 reaccionó con una clara disminución en la proliferación ante el tratamiento con ambas concentraciones de ICI 182 780 (10^{-7} M y 10^{-4} M).

Cuadro 1. Efectos del estradiol y del antiestrógeno ICI 182 780 sobre la proliferación de las líneas celulares MCF-7, SiHa, CaSki y C33. (* = estadísticamente significativo con un α de 0.05)

Concentración de Estradiol	MCF-7 (% con respecto al control)	SiHa ((% con respecto al control)	CaSki ((% con respecto al control)	C33 ((% con respecto al control)
1×10^{-9}	134.5*	101.5	113.5	100.2
1×10^{-7}	—	100.9	102.0	97.1
Concentración de ICI 182780				
1×10^{-7}	55.2*	93.4	89.8	107.5
1×10^{-4}	38.9*	73.3*	51.7*	80.4*

Expresión del RNA del Receptor de Estrógenos en las líneas de cáncer cervical

Con el fin de tratar de correlacionar la expresión del Receptor de Estrógenos en las líneas celulares utilizadas y el efecto del tratamiento con estradiol e ICI 182780, se realizó una RT-PCR con RNA extraído de cada una de ellas. El producto de 470 pb pudo ser detectado en el control positivo (MCF-7), así como en la línea CaSki. En las líneas celulares C33 y SiHa no pudo detectarse RNA para el RE (Figura 11).

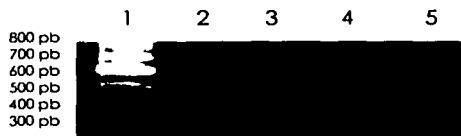


Figura 11. RT-PCR para exones 7 y 8 del RE de las líneas celulares (1) Marcador de Pesos Moleculares (100 bp DNA Ladder, Gibco BRL, Invotrogen Corp. Carlsbad, California); (2) MCF-7, (3) SIHa, (4) C33 y (5) CaSki.

DISCUSIÓN

El estradiol y los antiestrógenos como el tamoxifén y el ICI 182 780 tienen efectos sobre la proliferación de líneas celulares de cáncer de la glándula mamaria relacionados a la expresión del receptor de estrógenos. Wazer *et al* (1989), reportaron un aumento en la proliferación de la línea celular de cáncer de mama RE (+) MCF-7 al incubarla por 9 días con estradiol 10 o 100 nM; y una disminución de la proliferación al tratarla con tamoxifén 1 y 5 μ M. Por su parte, De Friend *et al* (1994), reportaron un aumento en la proliferación dependiente de la dosis de la línea celular de cáncer de mama RE (+) MCF-7 al tratarse con estradiol a concentraciones entre 10^{-12} y 10^{-8} M. Estos últimos autores reportaron también un efecto antiestrogénico sobre la misma línea celular del tamoxifén y del ICI 182 780, éste último a concentraciones mayores a 10 nM, ambos efectos estarían muy posiblemente relacionados a la presencia del RE.

Al igual que con el cáncer de mama, se ha tratado de establecer una relación entre los efectos del estradiol y de los antiestrógenos con la presencia del RE en células de cáncer de cérvix (Bhattacharya *et al*, 1997; Fujiwara *et al*, 1997; Hwang *et al*, 1992; Lu *et al*, 1999; Toki *et al*, 1997).

En este estudio, se encontró un efecto proliferativo sobre la línea celular de cáncer de mama RE (+) MCF-7 al tratarse con una concentración de estradiol 10^{-9} M, lo que coincide con lo reportado anteriormente (De Friend *et al*, 1994). Este resultado nos indica que el ensayo XTT puede utilizarse de manera equivalente a las otras técnicas utilizadas anteriormente para medir proliferación en líneas celulares. De Friend *et al* (1994), utilizaron el ensayo clonogénico Courtenay-Mills

mientras que Wazer *et al* (1989), por su parte, utilizaron siembra en placas de 24 pozos y cuenta con hemocitómetro.

Las líneas celulares de cáncer de cérvix no mostraron ningún efecto proliferativo estadísticamente significativo (α de 0.05) ante el tratamiento con estradiol a las dos concentraciones utilizadas (10^{-9} y 10^{-7} M), a pesar de que la línea CaSki resultó ser RE (+) por la RT-PCR. Por lo tanto, no se encontró correlación alguna entre los efectos del estradiol sobre la proliferación de las líneas celulares y la expresión del RE. Sin embargo, a pesar de no ser significativo, el mayor porcentaje de aumento en la proliferación con respecto al control se encontró en la línea celular CaSki RE (+) a ambas concentraciones de estradiol.

Hyder *et al* (1997) sugieren que el RE se una a algunos genes como monómero y a otros como dímero. Probablemente la cantidad de RE en las líneas celulares de cérvix no sea la suficiente como para formar la cantidad de complejos necesarios y así activar la transcripción de los factores de crecimiento que harían evidente un aumento en la proliferación. Por otra parte, el porcentaje de aumento en la proliferación con respecto al control fue menor a la concentración de 10^{-7} M con respecto a la concentración de estradiol 10^{-9} M, sugiriendo un posible efecto citotóxico a la concentración más alta.

Kim *et al* (2000), reportaron anteriormente la proliferación de las líneas celulares CaSki y HeLa causada por el tratamiento con $17\text{-}\beta$ estradiol a 10^{-6} M y por tamoxifén 10^{-7} M. Reportaron también, un efecto nulo sobre la proliferación de la línea C33A y lo relacionaron con la ausencia del VPH, ya que las líneas celulares CaSki y HeLa son positivas al VPH-16 y 18 respectivamente a diferencia de C33A. Se ha encontrado también, que el

tamoxifén, a concentraciones de 10^{-9} y 10^{-11} M estimula la proliferación de la línea de cáncer de cérvix SFR, que es RE (-), por estimular la transcripción del mRNA de la proteína E7 del VPH. En el mismo estudio Kim *et al* (2000), realizaron la transfección de células C33A con un plásmido reportero URR-CAT (Upstream Regulatory Region - Chloramphenicol Acetyl Transferase) de VPH-18 y/o con un vector de expresión del RE. Las células RE (-) transfectadas con el URR del VPH mostraron un ligero aumento en la transcripción después de tratarse con estradiol o tamoxifén 5×10^{-7} M. Las células RE (+) transfectadas con el URR del VPH mostraron un significativo aumento en la transcripción (4.8 veces mayor al control) al tratarse con las mismas concentraciones de estradiol o tamoxifén. Estos resultados sugieren que el efecto del estradiol sobre las líneas celulares de cáncer de cérvix sí se relacionan con la presencia del RE pero no por sí solo, sino aunado a la presencia del VPH. Se necesitan realizar más experimentos para buscar una relación entre la expresión del VPH en las líneas celulares de cáncer de cérvix utilizadas, la expresión de RE y la falta de proliferación de las mismas ante el tratamiento con estradiol.

En cuanto al tratamiento con el antiestrógeno, la línea celular MCF-7 disminuyó su proliferación al tratarse con ICI 182 780 10^{-7} y 10^{-4} M. La disminución en la proliferación coincide con lo reportado anteriormente por De Friend *et al* (1994).

Las tres líneas celulares de cáncer de cérvix tratadas mostraron una disminución en la proliferación significativa (α de 0.05), sólo a la concentración del antiestrógeno 10^{-4} M a pesar de que la línea celular CaSki es RE (+). Los resultados muestran una disminución en la proliferación independiente de la presencia del RE cuando las líneas celulares de cáncer de cérvix son tratadas con el antiestrógeno puro ICI 182 780. Como

ya se había mencionado, el ICI tiene efectos antiproliferativos independientes del RE, como la disminución en la proliferación causada por IGF-1 (Huynh *et al.*, 1996; Huynh *et al.*, 2001; Chan *et al.*, 2001) debida a la disminución en la expresión del receptor de este factor de crecimiento, o la disminución en la expresión de c-fos (Hyder *et al.*, 1997).

Al comparar el porcentaje de disminución con respecto al control de las tres líneas celulares, la línea celular CaSki muestra una mayor disminución en la proliferación que las otras dos líneas cuando son tratadas con ICI $182\ 780\ 10^{-4}\ M$. Probablemente la presencia del RE en la línea celular CaSki influya en la mayor disminución en la proliferación; sin embargo, la cantidad del mismo probablemente no sea suficiente para lograr una disminución en la proliferación a la concentración $10^{-7}\ M$ de ICI 182 780.

Howell *et al.* (1996), reportaron la administración de ICI 182 780 a mujeres con cáncer de mama avanzado a concentraciones de 1 a $3 \times 10^{-8}\ M$, lo que sugiere que la concentración de $10^{-4}\ M$ pudo haber causado un efecto citotóxico en las células por ser mayor a las dosis que se han utilizado en pacientes. Probablemente la disminución en la proliferación no se deba a los efectos antiproliferativos del ICI 182 780 sino a los efectos citotóxicos que puede tener sobre las líneas celulares por encontrarse a altas concentraciones.

En este trabajo no se encontró relación alguna entre la expresión del RE y los efectos en la proliferación inducidos por estradiol o por el antiestrógeno ICI 182 780 en líneas celulares de cáncer cérvico uterino. Sin embargo, se han reportado muchos efectos de las hormonas esteroides sobre la proliferación de células hormono responsivas. El estradiol podría

regular al proto-oncogen bcl-2 o a genes de resistencia a múltiples fármacos y causar cierto efecto sobre la radioresistencia a agentes quimioterapéuticos; además de que este efecto probablemente podría ser revertido por el uso de antiestrógenos. Los progestágenos, por su parte, podrían ser las hormonas esteroides que tengan un mayor efecto proliferativo sobre las células de cáncer cérvico uterino, por lo que se deben estudiar también los posibles efectos de la progesterona y de los antiprogestágenos sobre el cáncer de cérvix. Se necesitan todavía muchos estudios para poder establecer los efectos de las hormonas esteroides sobre las células de esta enfermedad.

CONCLUSIONES

- El ICI 182 780 disminuyó la proliferación de las tres líneas celulares de cáncer de cérvix a una concentración 10^{-4} M. Esta disminución se debe probablemente a efectos antiproliferativos del mismo independientes del RE, como la disminución en la proliferación causada por IGF-1 o la disminución de la expresión de c-fos; aunque esta disminución pudo deberse también a efectos citotóxicos.

- Los efectos del antiestrógeno puro ICI 182 780 sobre las células de cáncer cérvico uterino deberán seguirse estudiando. El uso de antiestrógenos puros podría eliminar otros efectos de los estrógenos que favorecen la progresión de la malignidad en las células de cáncer de cérvix; como el aumento en la supervivencia de células infectadas con VPH y la disminución en la respuesta a modalidades terapéuticas utilizadas como tratamiento. También, deberán evaluarse los efectos de otras hormonas esteroides como la progesterona; probablemente, la progesterona sea la hormona esteroide con mayor efecto sobre la progresión de la malignidad en este tipo de cáncer. Por lo tanto, los antiprogestágenos también podrían ayudar a revertir la resistencia a la radiación y la proliferación inducidos por progesterona.

REFERENCIAS

- Alfaro E, García C, Dueñas A. Métodos de Detección de la Apoptosis, Aplicaciones y Limitaciones. *Rev Inst Natl Cancerol (Mex)* 2000; 46: 275-280.
- Arceci RJ, Baas F, Raponi R, Horwitz SB, Housman D, Croop JM. Multidrug Resistance Gene Expression is Controlled by Steroid Hormones in the Secretory Epithelium of the Uterus. *Mol Reprod Dev* 1990; 25: 101-109.
- Barrón A, Bermejo L, Castro I. El Receptor de Estrógenos y la Glándula Mamaria. *Rev Inv Clin* 1997; 49: 515-528.
- Bartholomew JS, Glenville S, Sarkar S, Burt DJ, Stanley MA, Ruiz-Cabello F, Chengang J, Garrido F, Stern PL. Integration of High-Risk Human Papillomavirus DNA is Linked to the Down-Regulation of Class I Human Leukocyte Antigens by Steroid Hormones in Cervical Tumor Cells. *Cancer Res* 1997; 57: 937-942.
- Beato M. Gene Regulation by Steroid Hormones, Review. *Cell* 1989; 56: 335-344.
- Bhattacharya D, Redkar A, Mitra I, Sutaria U, MacRae KD. Oestrogen Increases S-phase Fraction and Oestrogen and Progesterone Receptors in Human Cervical Cancer in vivo, *Br J Cancer* 1997; 75: 554-558.
- Biing T, Yang F, Liu S, Ye T, Chao F. The Induction of Multidrug Resistance in Human Cervical Carcinoma Cell Lines by Estrogenic Hormones. *Proc Natl Sci Counc Repub China B* 1994; 18: 64-70.
- Bosch FX, Manos MM, Manos N, Muñoz N, Sherman M, Jansen A, Peto J, Schiffman M, Moreno V, Kurman R, Shah K. Prevalence of Human Papillomavirus in Cervical Cancer: A Worldwide Perspective. *J Natl Cancer Inst* 1995; 81: 796-802.
- Chan TW, Pollak M, Huynh H. Inhibition of Insulin-Like Growth Factor Signaling Pathways in Mammary Gland by Pure Antiestrogen ICI 182 780. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 2545-2554.
- DeFriend DJ, Anderson E, Bell J, Wilks DK, West DML, Mansel RE, Howell A. Effects of 4-Hydroxytamoxifen and a Novel Pure Antioestrogen (ICI 182 780) on the Clonogenic Growth of Human Breast Cancer Cells in Vitro. *Br J Cancer* 1994; 70: 204-211.

- Dudley MW, Sheeler CQ, Wang H, Khan S. Activation of the Human Estrogen Receptor by the Antiestrogens ICI 182 780 and Tamoxifen in Yeast Genetic Systems: Implications for Their Mechanism of Action. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 3696-3701.
- Dueñas A. El Gen del Receptor de Estrógenos en el Cáncer de Mama. ¿Amigo o Enemigo?. *Rev Inst Nal Cancerol* 1999; 45: 38-42.
- Eluf-Neto J, Ramalho C. Cervical Cancer in Latin America. *Semin Oncol* 2001; 28: 188-197.
- Ferguson A, Lapidus R, Baylin S, Davidson N. Demethylation of the Estrogen Receptor Gene in Estrogen Receptor-Negative Breast Cancer Cells can Reactivate Estrogen Receptor Gene Expression. *Cancer Res* 1995; 55: 2279-2283.
- Fujiwara H, Tortolero-Luna G, Mitchell M, Koulos J, Wright T. Adenocarcinoma of the Cervix. Expression and Clinical Significance of Estrogen and Progesterone Receptors. *Cancer* 1997; 79: 505-512.
- González-Garay L, Barrera-Saldana A, Aviles B, Alvarez-Salas M, Gariglio P. Prevalence in two Mexican Cities of Human Papillomavirus DNA Sequences in Cervical Cancer. *Rev Invest Clin* 1992; 44: 491-499.
- Gorski J, Furlow D, Murdoch F, Fritsch M, Kanero K, Ying C, Malayer J. Perturbations in the Model of the Estrogen Receptor Regulation of Gene Expression. *Biol Reprod* 1993; 48: 8-14.
- Guyton A, Hall, J. Tratado de Fisiología Médica. Mc Graw Hill Interamericana, 9ª. Edición. México, 1996.
- Hildesheim A, Reeves WC, Brinton LA, Lavery C, Brenes M, De la Guardia ME, Godoy J, Rawes W. Association of Oral Contraceptive Use and HPV in Invasive Cervical Cancers. *Int J Cancer* 1990; 45: 860-864.
- Hinojosa LM, Dueñas A. Papel de la Quimioterapia en el Tratamiento del Carcinoma Cervicouterino. *Rev Inst Nal Cancerol* 2000; 46: 47-57.
- Howell A, DeFriend DJ, Robertson JFR, Blamey RW, Anderson L, Anderson E, Sutcliffe FA, Walton P. Pharmacokinetics, Pharmacological and Anti-Tumor Effects of the Specific Anti-Oestrogen ICI 182 780 in Women with Advanced Breast Cancer. *Br J Cancer* 1996; 74: 300-308.
- Howley P. Role of the Human Papillomavirus in Human Cancer. *Cancer Res* 1991; 51: 5019-5026.

- Hu XF, Nadalin G, De Luise M, Martin TJ, Wakeling A, Huggins R, Zalcberg JR. Circumvention of Doxorubicin Resistance in Multi-Drug Resistant Human Leukaemia and Lung Cancer Cells by the Pure Antioestrogen ICI 164 384. *Eur J Cancer* 1991; 27: 773-777.
- Huynh H, Alpert L, Alaoui-Jamali MA, Ng CY, Chan TW. Co-administration of Finasteride and the Pure Anti-Oestrogen ICI 182,780 Act Synergistically in Modulating the IGF System in Rat Prostate. *J Endocrinol* 2001; 171: 109-118.
- Huynh H, Nickerson T, Pollak M, Yang X. Regulation of Insulin-Like Growth Factor I Receptor Expression by the Pure Antiestrogen ICI 182 780. *Clin Cancer Res* 1996; 2: 2037-2042.
- Hwang J, Lin B, Tang F, Yu W. Tamoxifen Stimulates Human Papillomavirus Type 16 Gene Expression and Cell Proliferation in a Cervical Cancer Cell Line. *Cancer Res* 1992; 52: 6848-6852.
- Hyder S, Chiappetta C, Murthy L, Stancel G. Selective Inhibition of Estrogen-Regulated Gene Expression *in Vivo* by the Pure Antiestrogen ICI 182 780. *Cancer Res* 1997; 57: 2547-2549.
- Khiong W, Klock G, Ulrich H. Progesterone and Glucocorticoid Response Elements Occur in the Long Control Regions of Several Human Papillomaviruses Involved in Anogenital Neoplasia. *J Virol* 1989; 63: 3261-3269.
- Kim C, Um S, Kim T, Kim E, Park T, Kim S, Namkoong S, Park S. Regulation of Cell Growth and HPV Genes by Exogenous Estrogen in Cervical Cancer Cells. *Int J Gynecol Cancer* 2000; 10: 157-164.
- Kyo S, Takakura M, Kanaya T, Zhuo W, Fujimoto K, Nishio Y, Orimo A, Inoue M. Estrogen Activates Telomerase. *Cancer Res* 1999; 59: 5917-5921.
- Lieberman B. The Estrogen Receptor Activity Cycle: Dependence on Multiple Protein-Protein Interactions. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression* 1997; 7: 43-59.
- Lu X, Shiozawa T, Nakayama K, Toki T, Nikaido T, Fujii S. Abnormal Expression of Sex Steroid Receptors and Cell Cycle-Related Molecules in Adenocarcinoma *In Situ* of the Uterine Cervix. *Int J Gynecol Pathol* 1999; 18: 109-114.
- Madrigal M, Janicek M, Brend-Uwe S, Perras J, Estape R, Peñalver M, Averette H. *In Vitro* Antigen Therapy Targeting HPV-16 E6 and E7 in Cervical Carcinoma. *Gynecol Oncol* 1997; 64: 18-25.

- Meneses-González F, Cos-Arroyo MT, Tapia-Conyer R. Evaluación de las Actividades de Detección y Seguimiento del Cáncer Cervicouterino en Población Bajo Cobertura de la Secretaría de Salud. México, 1992. *Rev Inst Nal Cancerol* 1994; 40: 168-177.
- Merideth C, Kamradt M, Mohideen N, Vaughan A. RU 486 Increases Radiosensitivity and Restores Apoptosis Through Modulation of HPV E6/E7 in Dexamethasone-Treated Cervical Carcinoma Cells. *Gynecol Oncol* 2000; 77: 177-182.
- Misiti S, Nanni S, Fontemaggi S, Cong YS, Wen J, Hirte HW, Piaggio G, Sacchi A, Pontecorvi A, Bacchetti S, Farsetti A. Induction of hTERT Expression and Telomerase Activity by Estrogens in Human Ovary Epithelium Cells. *Mol Cell Biol* 2000; 20: 3764-3771.
- Mohar A, Frías-Mendivil M, Suchil-Bernal L, Mora-Macias T, De la Garza JG. Epidemiología Descriptiva de Cáncer en el Instituto Nacional de Cancerología de México. *Salud Pública Mex* 1997; 39: 253-258.
- Paridaens R, Heuson J, Julien J, Veyret C, Van Zyl J, Klijn JGM, Silvestre R, Mignolet F. Assessment of Estrogenic Recruitment Before Chemotherapy in Advanced Breast Cancer: A Double-Blind Randomized Study. *J of Clin Oncol* 1993; 11: 1723-1728.
- Rutz HP, Mariotta M, Von Knebel D, Mirimanoff RO. Dexamethasone-Induced Radioresistance Ocurring Independent of Human Papilloma Virus Gene Expression in Cervical Carcinoma Cells. *Strahlenther Onkol* 1998; 174: 71-74.
- Shiau A, Barstad D, Loria P, Cheng L, Kushner P, Agard D, Greene G. The Structural Basis of Estrogen Receptor/Coactivator Recognition and the Antagonism of This Interaction by Tamoxifen. *Cell* 1998; 23: 927-937.
- Suzuki Y, Nakano T, Arai T, Morita S, Tsujii H, Oka K. Progesterone Receptor is a Favorable Prognostic Factor of Radiation Therapy for Adenocarcinoma of the Uterine Cervix. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2000; 47: 1229-1234.
- Teixeira C, Reed J, Pratt MAC. Estrogen Promotes Chemotherapeutic Drug Resistance by a Mechanism Involving Bcl-2 Proto-Oncogene Expression in Human Breast Cancer Cells. *Cancer Res* 1995; 55: 3902-3907.
- Tohan T, Mann V, Mclanghlin J, Harnish D, Yu H, Smith D, Davis R, Shier M, Rawes W. PCR-Detected Genital Papillomavirus Infection:

Prevalence and Association with Risk Factors for Cervical Cancer. *Int J Cancer* 1991; 49: 856-860.

▪ Toki T, Shiozawa T, Hosaka N, Ishii N, Nikaido T, Fujii S. Minimal Deviation Adenocarcinoma of the Uterine Cervix has Abnormal Expression of Sex Steroid Receptors, CA125, and Gastric Mucin. *Int J Gynecol Pathol* 1997; 16: 111-116.

▪ Vargas M, Palacios E, Kuri P, Méndez R. Magnitud del Cáncer Cérvico Uterino en México. *Gac Méd Méx* 1998; 134: 365-368.

▪ Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ, Muñoz N. Human Papillomavirus is a Necessary Cause of Invasive Cervical Cancer Worldwide. *J Pathol* 1999; 189: 12-19.

▪ Wazer D, Tercilla O, Peck-Sun L, Schmidt-Ullrich R. Modulation in the Radiosensitivity of MCF-7 Human Breast Carcinoma Cells by 17 β -Estradiol and Tamoxifén, *Br J Radiol* 1989; 62: 1079-1083.