

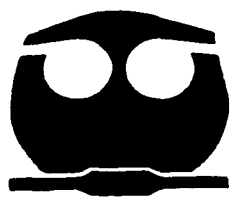


**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

**FACULTAD DE QUIMICA**

**ANTIESTROGENOS, MECANISMO, FUNCION Y  
APLICACIONES CLINICAS.**

**TRABAJO MONOGRAFICO  
DE ACTUALIZACION  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA  
P R E S E N T A :  
DIANA ANGELICA GUZMAN PEÑA**



**MEXICO, D.F.**



**2002**

**EXAMENES PROFESIONALES  
FACULTAD DE QUIMICA**

**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).

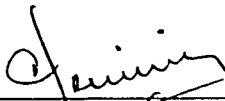
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición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

**Jurado asignado:**

Presidente	QFB.	Rosa María Erendida Paez Aguirre
Vocal	QFB.	Rafael Rión Arriola
Secretario	M en C.	Cristina Lemini Guzmán
1er. Suplente	QFB.	Héctor Antonio Ponce Monter
2o. Suplente	QFB.	Andrés Navarrete Castro

Facultad de Medicina.  
Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, UNAM.

Asesor:



M en C. Cristina Lemini Guzmán

Sustentante:



Diana Angélica Guzmán Peña

---

Dame, Señor, agudeza para entender,  
Capacidad para retener,  
Método y facultad para aprender,  
Sutileza para interpretar,  
Gracia y abundancia para hablar.

Dame acierto al empezar,  
Dirección al progresar  
Y perfección al acabar.

**Santo Tomás de Aquino.**

---

---

## AGRADECIMIENTOS

A mis Padres Isauro y Gloria por todo su amor, cariño y comprensión; sin ustedes no lo hubiera logrado.

A la M en C. Cristina Lemini Guzmán por su paciencia, apoyo y cariño en la realización de este trabajo.

A mis hermanas por su cariño, ejemplo y fortaleza.

A Jesús Chávez por todo tu amor, apoyo y cariño compartido todo este tiempo maravilloso que hemos pasado juntos.

A la QFB. Griselda Silva L. por esa maravillosa amistad, cariño y apoyo cuando más te necesité

A la Dra. Emelia Arriaga A. Por nuestra amistad que me llevo a encontrar el camino; y en memoria de el Dr. Gregorio Cervantes L. por esos consejos insuperables que dan fortaleza cada vez que se recuerdan.

A la Psic. Mari cruz Arias S. Por tu amistad, paciencia, apoyo y consejos que me motivan a seguir a delante y ver la vida de otra forma dándole el mejor sentido posible para alcanzar el equilibrio de la felicidad.

A la Lic. Alexandra Chávez y el Lic. Rubén Olvera por su valiosa amistad.

---

---

## **AGRADECIMIENTO ESPECIAL**

A la Universidad Nacional Autónoma de México, que prepara día con día a los profesionales del mañana y en especial a el Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina ( UNAM ) donde se realizo este trabajo bajo la tutoría de la M en C. Cristina Lemini Guzmán.

---

## INDICE

1.	RESUMEN	3
2.	ANTECEDENTES	4
3.	JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVO	9
4.	MECANISMO DE ACCIÓN DE ESTRÓGENOS	10
4.1	Receptores de estrógenos (Receptor $\alpha$ y Receptor $\beta$ )	13
4.2	Proteínas asociadas receptor-estrógeno	17
4.3	Elementos de respuesta a antiestrógenos	18
4.4	Regulación de los receptores de estrógenos	19
5.	ANTIESTRÓGENOS	21
5.1	Diferencias entre antiestrógenos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	23
5.2	Relaciones estructura-actividad	25
5.3	Mecanismos de acción de antiestrógenos	30
5.4	Antiestrógenos y el ciclo celular	32
5.5	Antiestrógenos y factores de crecimiento	33
5.6	Mutación del receptor y antiestrógenos	36
5.7	Interacciones de antiestrógenos con elementos de respuesta a estrógenos (EREs)	37
6.	BENEFICIO-RIESGO DE LA ADMINISTRACIÓN DE ANTIESTRÓGENOS	38
6.1	Función endócrina de antiestrógenos	38
6.2	Cáncer de mama	39
6.3	Antiestrógenos en huesos y lípidos	40
6.4	Efectos adversos de los antiestrógenos	43
6.5	Carcinogénesis uterina y hepática	44
6.6	Mecanismo de resistencia al fármaco	46
6.7	Metabolismo de antiestrógenos	49
7.	NUEVOS COMPUESTOS Y NUEVAS OPORTUNIDADES	52
7.1	Moduladores selectivos del receptor de estrógenos (Selective estrogen receptor modulators; SERMS)	53
8.	CONCLUSIONES	63
9.	BIBLIOGRAFÍA	64

---

**ABREVIATURAS**

RE	Receptor de Estrógeno
DUH	Dominio de Unión de la Hormona
RE $\alpha$	Receptor de Estrógenos $\alpha$
RE $\beta$	Receptor de Estrógenos $\beta$
DMBA	Dimetilbenzantraceno
FA	Función de Activación
DUD	Dominio de Unión del DNA
SLN	Señales de Localización Nuclear
Ser	Serotonina
RNA	Ácido Ribonucleico
ERE	Elementos de Respuesta a Estrógenos
RP	Receptor de Progesterona
RT	Receptor de Hormona Tiroidea
RAR	Receptor de Ácido Retinóico
EUTAMPc	Elementos de Unión de Transcripción AMPc
MSRT	Mediador Silenciante para los Receptores de Hormona Tiroidea y Retinóica
CoR-N	Correceptor del Receptor Nuclear
DUL	Dominio de Unión del Ligando
DEB	Dietilestilbestrol
TACE	Trip-anisilcloroetileno
RH	Receptor de hormona
CREB	Elemento de respuesta de Unión de la proteína de transcripción ligando a AMPc
CBP	Proteína de unión asociada a CREB
PARE	Proteína asociada a el Receptor de Estrógenos
ERR	Elementos de Respuesta a el Raloxifen
PCNE	Perturbación Conformacional no Especifica
PCE	Perturbación Conformacional Especifica
SERM	Selective Estrogen Receptor Modulator



## 1. RESUMEN

Los estrógenos son hormonas que se producen principalmente en los ovarios, estimulan la proliferación y el crecimiento de las células encargadas del desarrollo y mantenimiento de los caracteres sexuales secundarios de la mujer. El estradiol ( $E_2$ ) es la hormona natural que selectivamente se une y es retenido por el útero, vagina y glándula pituitaria donde se une a receptores específicos. La activación del receptor y su posterior translocación con aceptores nucleares específicos denominados elementos de respuesta estrogénica (EREs) propicia la activación de la RNA y DNA polimerasas que inician la síntesis de proteínas y la proliferación celular específica.

La aplicación clínica de los estrógenos como anticonceptivos orales han sido de los descubrimientos de mayor trascendencia del siglo XX. Así mismo los descubrimientos de Lener y colaboradores del primer antiestrogeno no esteroide y el descubrimiento de Jensen del sitio de acción de los estrógenos hace 40 años dio como resultado un gran número de posibilidades para el desarrollo clínico de nuevos fármacos. Los antiestrógenos juegan un papel importante en la terapia antitumoral principalmente en el cáncer de mama donde han tenido una aplicación muy amplia y producen un beneficio reconocido.

El objetivo de este trabajo ha sido revisar los estudios relacionados con el mecanismo de acción de los estrógenos y antiestrógenos, con el objeto de proporcionar material actualizado y de fácil manejo para estudiantes e interesados en el conocimiento de este tema. Esta revisión presenta nueve capítulos. El segundo presenta los antecedentes históricos desde el descubrimiento de la acción gonadal hasta el discernimiento del mecanismo de acción. El tercer capítulo indica la justificación y objetivo de este trabajo. El cuarto capítulo describe el mecanismo de acción del efecto estrogénico, así como la caracterización de los receptores estrogénicos y su regulación. En el capítulo quinto se describe la clasificación de los antiestrógenos y su interacción con los estrógenos. El capítulo sexto contiene la revisión de algunos estudios de relación estructura-actividad. En el capítulo séptimo se analizan las aplicaciones clínicas de los antiestrógenos y posteriormente se discuten las perspectivas futuras de nuevos antiestrógenos. En el capítulo octavo se analizan las conclusiones y en el capítulo noveno la bibliografía.

## 2. ANTECEDENTES

La naturaleza hormonal de los ovarios del sistema reproductor femenino fue establecida en 1900 por Knauer, quién descubrió que la remoción de estas gónadas producía atrofia uterina y pérdida de las funciones sexuales, y los trasplantes de ovarios prevenían los síntomas de gonadectomía. Estas observaciones se complementaron por los hallazgos de Halban (1900), quién demostró que si las glándulas se transplantaban en animales inmaduros castrados se aseguraba la normalidad del desarrollo y de las funciones sexuales.

En 1923 Allen y Doisy desarrollaron un método cualitativo sencillo de análisis biológico para extractos ováricos, basado en los cambios producidos en los exudados vaginales de la rata. Esto permitió que Loewe y Frank en 1925 pudieran detectar la presencia de una hormona sexual femenina en la sangre de diversas especies. Posteriormente Loewe y Lange en 1926, detectaron una hormona sexual femenina en la orina de las mujeres menstruantes cuya concentración era variable según la fase del ciclo menstrual en la que estas se encontraban. Zondek, en 1928 anunció la excreción de grandes cantidades de estrógenos en la orina durante el embarazo, este hallazgo fue muy útil para los químicos, ya que pronto aislaron la sustancia activa en forma cristalina, y años después se dilucidó su estructura química (figura 1; Goodman y Gilman, 1996).

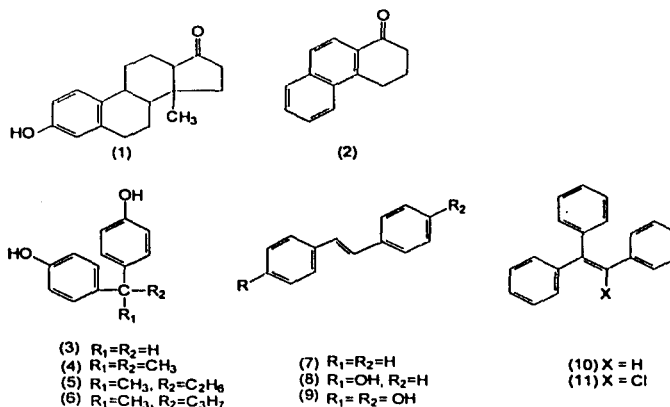


Figura 1. Fórmulas de compuestos reportados con actividad estrogénica *in vivo* en 1930. Se creía que al compuesto 1 le correspondía la estructura molecular de la estrona llamada entonces ceto-hidroxiestrina.

Desde 1930 se inició la búsqueda de estructuras de moléculas sencillas que produjeran efectos estrogénicos. El primer compuesto reportado de estructura conocida al que se evaluó su actividad estrogénica fue el 1-ceto-1, 2, 3, 4-tetrahidrofenantreno (figura 1, compuesto 2) por la analogía estructural que tenía este con la llamada cetohidroxiestrina (figura 1, compuesto 1) que posteriormente se estableció como la estrona. Sir Charles Dodds inició los estudios de la relación estructura-actividad de estrógenos no esteroideos, al encontrar que los hidroxiestilbenos (figura 1, compuestos 7-9) eran potentes estrógenos, concluyendo que no era necesario el núcleo fenantrénico para que se presentara el efecto estrogénico. También fue Dodds quien reportó que el anol, un fenol derivado de anetol (figura, 2) producía una marcada actividad estrogénica. Sin embargo, estos resultados no se reprodujeron con diferentes lotes de anol, mas tarde se descubrió que la actividad estrogénica observada era debida a un contaminante de dimerización del anol, el dianol, compuesto con propiedades estrogénicas potentes (figura 2). Por esa misma época, Dodds encontró que la sustitución del estilbeno con grupos etilo producía un compuesto con una actividad estrogénica muy potente, el dietilestilbestrol (DEB; figura 2). La similitud estructural entre el DEB y el Estradiol ( $E_2$ ) es notable. En un intento de analizar el efecto de rigidez del sistema, se sintetizó y evaluó el dihiroxihexahidrocriseno (figura 2) cuya potencia estrogénica, era aproximadamente 1/2000 de la potencia del DEB. Estas investigaciones dieron como resultado el desarrollo de una gran cantidad de compuestos sintéticos con aplicación clínica.

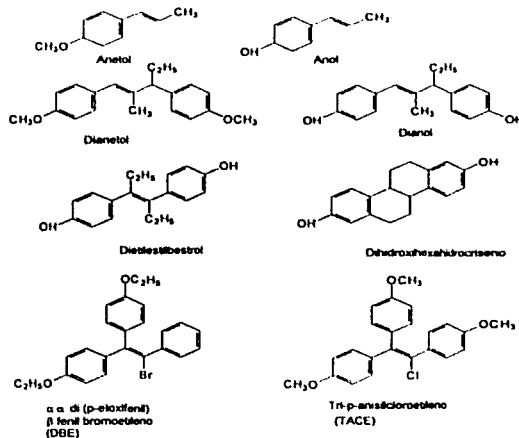


Figura 2. Fórmulas de compuestos no esteroideos con actividad estrogénica *in vivo*.

El trifeniletileno producía actividad estrogénica débil, induciendo cornificación vaginal en ratones. El reemplazo de uno de sus hidrógenos por un grupo cloro (figura 1) condujo a un compuesto de mayor potencia y duración de la acción estrogénica. Así mismo el di(p-etoxifenil)-β-fenil bromoetileno (DBE; figura 2) fue activo por vía oral, su acción estrogénica de larga duración se debía a su almacenamiento en el tejido graso. El compuesto tri-p-anisilcloroetileno (TACE; figura 2) se desarrolló a raíz de estos hallazgos y es utilizado clínicamente como estrógeno de larga duración.

Por otra parte la duración de la acción del DEB pudo incrementarse por esterificación de los grupos fenólicos. Una dosis de 10 µg de dipropionato dietilestilbestrol produjo efectos estrogénicos por mas de 50 días en ratas mientras que el DEB a la misma dosis era activo por 5 días.

En la década de los 50s, se desconocía como los estrógenos producían sus efectos. Los sitios blancos para las acciones específicas de los estrógenos sobre el sistema reproductivo habían sido identificados por Allen y Doisy (1923), ensayando hormonas "estimulantes del estro" del ovario, sin embargo se desconocía por qué tejidos como el útero y la vagina respondían a los estrógenos mientras que otros como el músculo no lo hacían. Estudios iniciales con hormonas marcadas con carbono 14, no pudieron detectar la localización de los sitios blanco (Twombly y Shoenevaldt, 1951), debido a que la actividad específica era demasiado baja, y se requería de compuestos marcados con tritio con actividad altamente específica.

En 1958 Lerner y sus colaboradores publicaron el primer trabajo de las propiedades farmacológicas del primer antiestrógeno no esterooidal etamoxitri-fetol o MER-25 (figura 3). Lerner escribió "el compuesto", es atractivo no solamente por que inhibe completamente la respuesta uterina del E<sub>2</sub> sino porque carece de las propiedades estimulantes uterinas, identificando a esta sustancia como un instrumento para el estudio del papel funcional de los estrógenos en el organismo. Posteriormente se estudiaron diferentes dosis de MER-25 contra una única dosis de benzoato de estradiol y varias dosis del E<sub>2</sub> fueron estudiadas contra una sola dosis del antagonista. Los resultados obtenidos demostraron un antagonismo competitivo.

En 1959, Jensen y Jacobson, comunicaron que habían sintetizado el [6-7-<sup>3</sup>H]E<sub>2</sub> y lo inyectaron en ratas hembras inmaduras detectando que la radioactividad proveniente del E<sub>2</sub> marcado estaba unida y retenida en los tejidos: útero, vagina y la pituitaria anterior pero no se encontraba en otros tejidos como el músculo, riñón, e hígado, identificándose los tejidos blanco específicos de la hormona natural E<sub>2</sub>. Estos estudios pioneros sugirieron la existencia de un receptor específico en estos tejidos. La identificación de la unión de estrógeno a una proteína en el útero de ratas inmaduras y la observación de H<sup>3</sup>-estradiol localizado en los núcleos de las

células blanco dieron lugar a la proposición de un modelo para describir el mecanismo de los eventos estrogénicos.

El estudio de la acción de estrógenos y antiestrógenos de manera conjunta se dio cuando Pincus, el padre de los anticonceptivos orales invitó a Jensen y a Jacobsen a presentar sus descubrimientos en 1960 en la conferencia titulada "Gula básica del mecanismo de acción de los estrógenos". Fueron presentados los trabajos acerca de la especificidad de respuesta de los tejidos blancos a los estrógenos, y de manera adicional, Jensen (1962) describió los primeros estudios que demostraron la actividad antiuterotrópica del MER-25 que dependía de su habilidad para inhibir la incorporación y retención de  $E_2$  en el útero de las ratas. De este modo, se estableció el fundamento del mecanismo de acción molecular de los antiestrógenos.

El MER-25 no pudo convertirse en un agente clínicamente útil debido a su toxicidad y baja potencia (Lerner, 1981); sin embargo, el MRL-41 o clomifeno (figura 3), demostró su efecto inductor de la ovulación por lo que es utilizado para el tratamiento de la infertilidad en mujeres anovulatorias (Holtkamp, 1960; Greenblatt, 1962).

La mayor utilidad clínica de los antiestrógenos se dio a finales de la década de 1970 con el desarrollo clínico del tamoxifeno (figura 3) para el tratamiento de cáncer de mama, lo que cambió la perspectiva del descubrimiento de nuevos fármacos antiestrogénicos (Lerner y Jordan, 1990; Jordan 1994).

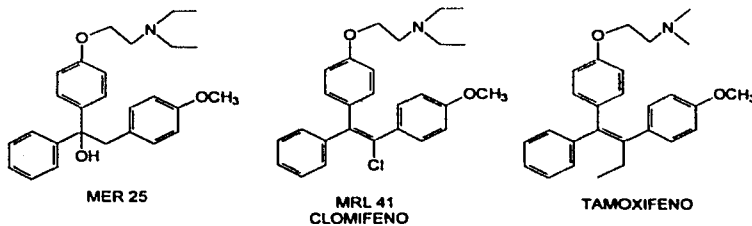


Figura 3.

El entendimiento del mecanismo de acción de los antiestrógenos mediado por receptores en los estudios de relación estructura actividad condujeron a cambios enormes en los conocimientos básicos y al desarrollo de los antiestrógenos como agentes para tratar enfermedades asociadas con la menopausia. Esto se debió a que el tamoxifeno es un antiestrógeno en mama pero tienen propiedades similares a la de los estrógenos en otros tejidos blancos tales como el hueso. El tamoxifeno se usa exclusivamente como agente preventivo para el tratamiento de todas las etapas de cáncer de mama (Jordan, 1997b).

Otros agentes novedosos como antiestrógenos se están evaluando no solamente como agentes antitumorales en cáncer de mama, sino también para la prevención de la osteoporosis (Gradishar y Jordan, 1997).

No se ha establecido una teoría única de la acción de antiestrógenos debido a que hay observaciones que aún no se entienden con los antiestrógenos que requieren de mayor estudio. 1) Esto es debido fundamentalmente a que las diferencias de las diferentes especies en la farmacología de los antiestrógenos son sorprendentes y se han explicado como diferencias de metabolismo, 2) La mayoría de los antiestrógenos exhiben acciones agonistas o agonistas parciales *in vivo*, pero *in vitro* los compuestos usualmente tienen cero de actividad intrínseca y 3) Se ha postulado que el tamoxifeno se une al llamado "sitio de unión para antiestrógenos" con especificidad estructural precisa y con alta afinidad. Este sitio de unión requiere ser definido bioquímicamente y su papel fisiológico necesita ser establecido.

### 3. JUSTIFICACION Y OBJETIVO

El descubrimiento de fármacos dirigidos a lograr una acción antiestrogénica selectiva en el tejido mamario y uterino preservando el efecto benéfico en el sistema óseo y sobre el metabolismo de los lípidos y colesterol a sido una meta de los últimos años. La información bibliográfica disponible es sumamente amplia en todos los campos, el presente trabajo esta dirigido a presentar una obra en donde se abordan los aspectos más relevantes de los antiestrógenos. Este trabajo esta dirigido tanto a el estudiante como al profesional de las áreas biológico-químicas.

En el presente trabajo monografico revisamos y analizamos la información reportada que estudia a los antiestrógenos en revistas científicas de carácter internacional a la fecha. Primero discutiremos el mecanismo de acción de estrógenos y antiestrógenos, la caracterización y regulación de sus receptores; así mismo, la clasificación de los antiestrógenos y algunos estudios de relación estructura-actividad. Finalmente se describen las aplicaciones de estos compuestos y sus perspectivas futuras en el desarrollo de nuevos fármacos.

#### 4. MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS ESTRÓGENOS

Los estrógenos al igual que otras hormonas esteroides, actúan principalmente por medio de la regulación de la expresión de genes. Una vez que las hormonas esteroides se han transportado desde su sitio de biosíntesis a sus células efectoras se inicia el mecanismo de acción hormonal. El primer hecho lo constituye el paso del esteroide en su forma libre (desprovisto de su proteína transportadora) al interior de la célula. Estas hormonas lipofílicas difunden de forma pasiva a través de la membrana plasmática y se distribuyen de acuerdo con su especificidad y su alta afinidad por el receptor que está presente en el núcleo y citoplasma de las células blanco. Las hormonas se unen a un receptor específico que se encuentra en el interior de la célula, formando un complejo hormona-receptor.

El RE es un factor de transcripción nuclear (King y Greene, 1984, Welshons, 1984). Una vez que el estrógeno se une al RE, se disocia de las proteínas de choque térmico a las que está unido produciéndose un cambio en la conformación y la homodimerización del receptor.

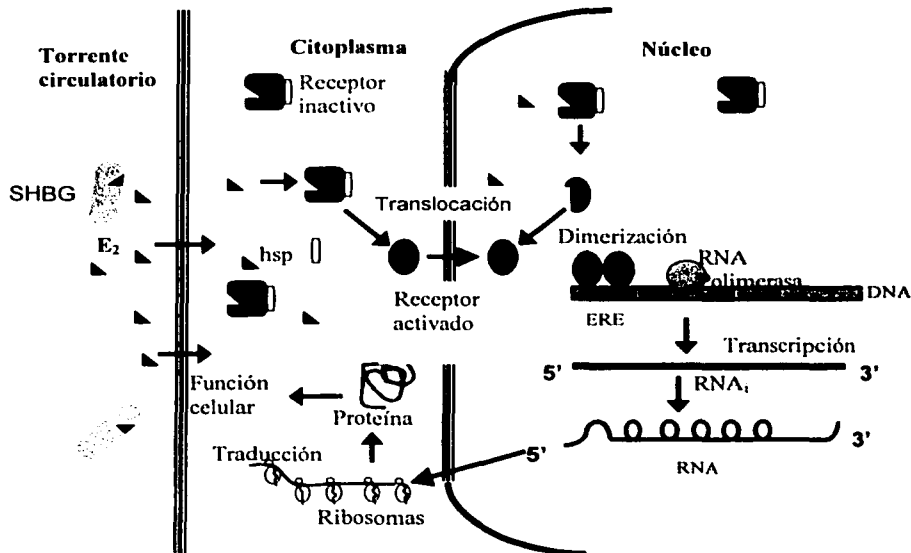


Figura 4. Mecanismo de acción de las hormonas esteroides.



El RE contiene dos áreas llamadas Funciones de activación (FAs): FA-1 y FA-2. Katzenellenbogen y colaboradores (1995) demostraron que las regiones FA-1 y FA-2 se expresan como polipéptidos separados y funcionalmente interactúan en la respuesta a los estrógenos y antiestrógenos, activando la respuesta transcripcional. También, cuando hay mutaciones en FA-1 o FA-2 se inhibe la actividad funcional de estos dominios y consecuentemente la actividad transcripcional. Cuando las mutaciones se realizan en el dominio de unión al ligando (DUL) que elimina la unión a estrógeno, no se detecta ninguna actividad transcripcional, se ha sugerido que la unión del estrógeno al RE facilita un cambio conformacional que inducen FA-1 y FA-2 en asociación de manera sinérgica dando como resultado la activación transcripcional.

Experimentalmente se ha calculado que la constante de disociación del receptor de  $E_2$  en el citosol es de aproximadamente  $1 \times 10^{-10}$  M, lo que indica la alta afinidad y especificidad de unión de las hormonas estrogénicas por su sitio receptor (Williams CL y Stancel GM, 1996).

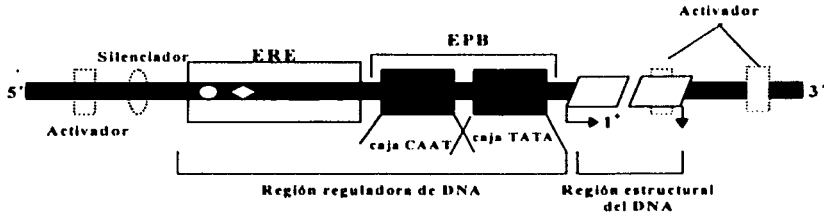


Figura 5. Requisitos para la regulación hormonal en la transcripción de genes. La transcripción inicia en la flecha, en donde 1+ significa el primer nucleótido del gene que es copiado. Inmediatamente a un lado, sobre el sitio 5', está el elemento promotor basal, el cual consiste de la caja TATA y otros componentes como la caja CAAT. Los elementos de respuesta a estrógenos pueden ubicarse en la región 5' o en el gen mismo. Las regiones estructurales que activan o silencian la transcripción pueden también estar localizada en varios sitios dentro o alrededor del gene (Tomado de: Garner DK, 1995).

La principal región reguladora es el elemento promotor basal (EPB), también conocida como "caja TATA" y la otra región es la caja CAAT, (figura 5; Garner DK, 1995).

Una vez que el RE se ha unido al estrógeno y es dimerizado, se une a elementos de respuesta a estrógenos (ERE) que están presentes en la región promotora de los genes. Estos EREs son 13 pares de bases de secuencias palindrómicas localizadas en el sitio de inicio de la transcripción. Los EREs funcionan aumentando el potencial transcripcional de un gen. El análisis de delección ha permitido la definición e identificación de la secuencia de los EREs. La secuencia exacta de los EREs varía entre especies y genes.

Algunos modelos para el estudio del mecanismo de acción de estrógenos predicen cuando el complejo dimerizado hormona receptor (HR) se une al ERE palindrómico formando una estructura ciclica, permitiendo al RE interactuar con el sistema transcripcional en el sitio de iniciación del RNA. Por lo tanto, el complejo HR puede reclutar componentes del complejo transcripcional y sirve como un sitio de nucleación.

Se ha propuesto que el RE se une al DNA en una estructura heterodimera que involucra una variedad de proteínas, tales como factores de transcripción y proteínas de unión al DNA. También se conoce que el estrógeno no es esencial para la unión de RE al DNA pero incrementa la afinidad del RE por los componentes nucleares (Gorski et al., 1993).

El elemento de respuesta de unión de la proteína de transcripción ligado a AMPc [transcription factor cAMP response element-binding protein (CREB)] tiene una proteína de unión asociada [associated protein CREB-binding protein (CBP), Smith et al., 1996]. La CBP interacciona específicamente con: RNA polimerasa II (Kee et al., 1996), TFIIB (Kwok et al., 1994), y CREB en su forma fosforilada (Chrivia et al., 1993). La habilidad de CBP para estimular la transcripción es a través de la RNA polimerasa II promotor genético. El CBP puede interactuar específicamente con miembros de la familia de receptores nucleares de hormonas esteroides incrementando la actividad transcripcional. También puede funcionar como un coactivador para el crecimiento acelerado en algunos factores de transcripción.

La expresión ectópica de CBP puede incrementar la actividad transcripcional del estrógeno dependiente de RE aproximadamente diez veces comparado con la expresión ectópica de SRC-1 (Smith et al., 1996). CBP es parcialmente capaz de revertir la interferencia transcripcional que el RE activado tiene sobre la actividad transcripcional de receptor de progesterona (RP). Sin embargo, esto sugieren que CBP puede estar presente en cantidades limitadas en las células específicas y ser capaz de modular la actividad de los receptores esteroidales. Cuando SRC-1 y CBP son coexpresados ectópicamente, la actividad transcripcional mediada por RE y el RP se incrementa de manera sinérgica, de lo que se ha concluido que estas dos proteínas no son funcionalmente homólogas.

Otras moléculas que son capaces de reprimir la transcripción basal inducida por receptores hormonales son dos correpresores llamados mediador silenciante para los receptores de hormona tiroidea y retinóica (MSRT, Chen y Evans, 1995) y el correpresor de receptor nuclear (CoR-N; Kurokawa et al., 1993) los cuales han sido clonados usando un sistema de levadura de doble híbrido. Ambos MSRT y CoR-N pueden interactuar con receptores de hormona tiroidea (RT) y de receptor ácido retinoico (RAR) a través de sus dominios homólogos específicos. Esto ha sugerido que la familia de correpresores evolucionalmente conservados pueden existir e

interactuar con otros receptores de hormonas esteroides. Los correceptores que actúan sobre el RE no han sido aún identificados, pero se cree que podrían existir.

#### 4.1 RECEPTORES DE ESTRÓGENOS (RECEPTOR $\alpha$ Y RECEPTOR $\beta$ )

Los receptores de hormonas nucleares son una familia de factores de transcripción que pueden iniciar o incrementar la transcripción de genes que tienen elementos de respuesta específica (EREs). Pertenecen a esta familia el receptor estrogénico alfa (RE $\alpha$ ) que fue clonado y secuenciado de células de cáncer de mama humana MCF-7. Este consiste de 595 aminoácidos con un peso molecular de 66 kDa y está constituido por seis diferentes dominios funcionales (figura 6). Dos de estos dominios están altamente conservados en la secuencia primaria de los miembros de la súper familia de receptores de hormonas nucleares. Uno de los dominios, el de unión a DNA (DUD), contiene los llamados dedos de Zinc que participan en la unión del receptor de los promotores para los genes que responden a la hormona. En la región terminal C, el dominio de unión de la hormona (DUH) contiene dos secuencias homologas con otros receptores hormonales que confieren especificidad y selectividad de la hormona (Carson-Jurica et al., 1990; Ortí et al., 1992). El RE humano se localiza en el cromosoma 6q sub banda 25, y el RE del ratón está localizado en el cromosoma 10.

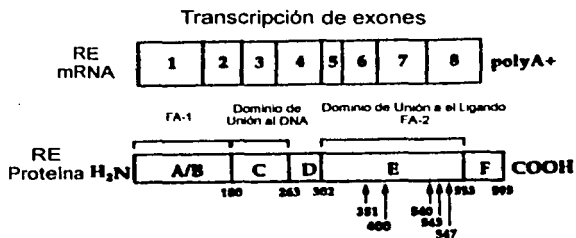


Figura 6. El RE consiste de seis dominios funcionales (FA) transcripcionales en ocho exones. El dominio funcional señala las mutaciones relevantes con una flecha.

Los modelos que explican el mecanismo de acción del RE en el núcleo y la activación de la transcripción de genes de respuesta a estrógenos, señalan que este efecto es bloqueado por antiestrógenos.

Los seis dominios estructurales del RE $\alpha$  son regiones que han sido caracterizadas en base a la funcionalidad de cada área. El dominio A/B contiene una de las dos FAs (Función de Activación) transcripcionales presentes en el RE (figura 7). FA-1 y FA-2 activan la transcripción de la célula y del promotor de manera específica, FA-1 y FA-2 están localizados en el N (nitrógeno) y C (carbono) terminales respectivamente.

FA-1 y FA-2 producen respuestas específicas, descritas en células HeLa y Levaduras Gal-4 en fibroblastos. Así, se piensa que FA-1 es responsable de la activación de promotores específicos transcripcionales independiente de la presencia del ligando y FA-2 provee la activación ligando específica (Berry et al., 1990).

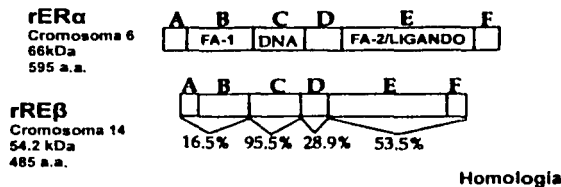


Figura 7. Comparación del RE $\alpha$  y RE $\beta$  proteína de rata (r) y la homología de los aminoácidos en las regiones funcionales.

La región C contiene el DUD y un dominio de dimerización. El DUD es una región altamente conservada en la súper familia de receptores nucleares. El DUD tiene dos dedos de zinc que se pliegan en dos dominios de la hélice coordinándose un zinc para cuatro cisteínas y una tercera hélice que se extiende desde los dedos de zinc. Estos dedos de zinc son componentes esenciales del RE debido a que cuando el RE carece del DUD, no puede unir DNA *in vivo* o *in vitro*. Sin embargo, la región C no es suficiente para unir un elemento de respuesta estrogénica (ERE). Como ya se menciona, la región A/B puede ser eliminada sin comprometer la unión a DNA pero la delección de los aminoácidos básicos (aminoácidos 256 a 270) localizados abajo de los dedos de zinc no permiten la unión del receptor a los EREs (Chambraud, 1990).

Hay similitudes en las regiones de los dedos de zinc sobre los diferentes receptores de hormonas esteroides, pero hay diferencias precisas para la especificidad de cada receptor. Se piensa que la especificidad de un cierto receptor está proporcionada por los dos dedos de zinc.

El requerimiento básico para la actividad de DUD, es la región C que puede unirse a la proteína de choque térmico 90 y es responsable de la localización nuclear del receptor. La región

C contiene tres lisinas y arginina que son independientes del ligando. Varias señales de localización nuclear (SLNs) han sido identificadas en el RE, una en el DUD y otras tres en el DUH.

Una SLN en el DUH (entre 256 a 303 aminoácidos) ha mostrado que se induce por el ligando, y las otras SLNs son independientes del ligando (Ylikomi et al., 1992).

En la región E, el DUH, contiene el FA-2 (promotor específico dependiente del ligando), una proteína de choque térmico 90 con una función de unión, una SLN (ligando-dependiente), y un dominio de dimerización. El DUH se encuentra en el C terminal y es responsable de el reconocimiento ligando-específico debido a que permite que el RE se active transcripcionalmente de una manera específica y selectiva. La DUH coordina a el DUD y la unión con el ligando, cambiando la conformación del receptor, y el DUD se vuelve transcripcionalmente activo.

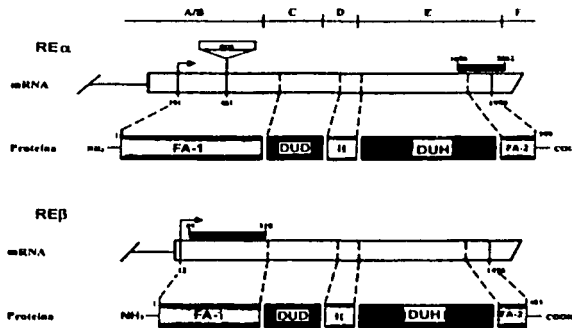


Figura 8. Esquemas de los mRNAs y las proteínas que codifican para el RE $\alpha$  y el RE $\beta$ . Se muestran las secuencias que codifican para los mRNAs de cada uno de los receptores de estrógenos así como las localizaciones aproximadas de aquellas secuencias que codifican los dominios modular específicos de las proteínas del receptor. Se muestran los dominios estructurales de estos receptores (A/B,C,D,E y F), así como los dominios de unión a la hormona, unión al DNA y funciones de transactivación (FA-1, FA-2) (Couse et al., 1997).

Recientemente un receptor denominado receptor  $\beta$  de estrógenos (RE $\beta$ ) fue clonado a partir de la biblioteca de un DNA de próstata de rata (Kuiper et al., 1996; Katzenellenbogen y Korach, 1997). Esta secuencia codifica una proteína de 485 residuos de aminoácidos de peso molecular de 54.2 kDa (figura 7). El RE $\beta$  comparte una homología substancial con el RE $\alpha$

especialmente en el DUD (95%) y el DUH (55%). RE $\alpha$  y RE $\beta$  son funcionalmente homólogos, se unen al E $_2$  con alta afinidad y ambos activan la transcripción de EREs en vitelogenina A2.

El RE $\beta$  de rata fue clonado y mapeado en el cromosoma 12 (Tremblay et al., 1997). El gen de RE $\beta$  se designó como Estrb. La pregunta más interesante tras la identificación de este nuevo RE es cuales son sus propiedades fisiológicas y farmacológicas (Tremblay et al., 1997). Existen diferencias y similitudes entre los mRE $\alpha$  y mRE $\beta$  así como diferentes formas de regulación. Por ejemplo, mRE $\beta$  pudo ser activado vía fosforilación de manera semejante al RE $\alpha$  (Bunone, 1996). Esto se debe a la zona altamente conservada de serina 60 que es fosforilada en las secuencias de RE $\beta$  del ratón, la rata y el humano. El RE $\beta$  en presencia de 4-OHT produce respuestas no genómicas diferentes. Esto se puede explicar por la falta de homología en los dominios del amino terminal de proteínas en AF-1 que es responsable de la actividad agonista parcial del tamoxifen en células que expresan el RE $\alpha$ .

El RE $\beta$  es codificado por un gen diferente del que codifica al RE $\alpha$ , (Kuiper et al., 1996; Mosselman et al., 1996; Katzenellenbogen y Korach, 1997). Estos difieren principalmente en el dominio N-terminal A/B, teniendo solo 18% aminoácidos de identidad. También son sustancialmente diferentes en el DUH mostrando solo 56% de aminoácidos de identidad (Figura 7). Las grandes diferencias en los dominios FA-1 sugieren que la activación transcripcional de diferentes genes responsivos a estrógenos por los REs  $\alpha$  y  $\beta$  deben mostrar patrones diferentes, de tal forma que se aprecia que la activación del gen está influenciada por factores promotor y célula específicos (Katzenellenbogen et al., 1996; Tzukerman et al., 1994; Berry et al., 1990; Montano et al., 1995) y por interacción sinergista entre los dominios de activación del receptor N-terminal y C-terminal (Kraus et al., 1995).

Los estudios de los subtipos del RE  $\alpha$  y  $\beta$ , así como de los plásmidos quiméricos preparados con ambos receptores para examinar las bioactividades de estos y su respuesta a ligandos estrogénicos y antiestrogénicos (McInerney et al., 1998), mostraron que la actividad transcripcional del RE $\beta$  es dependiente de célula/promotor y de la naturaleza del ligando. Antiestrógenos tales como el tamoxifeno y 2-fenilbenzofuran que muestran actividad sobre el RE $\alpha$ , no exhiben actividad agonista a través del RE $\beta$ .

Las diferencias en las regiones N-terminal del RE $\alpha$  y el RE $\beta$  contribuyen a las diferencias en la actividad transcripcional célula y promotor específico de estos receptores y su habilidad para responder a diferentes ligandos, dando así lugar a un mecanismo para la regulación diferencial de la transcripción por estos dos REs (McInerney et al., 1998).

RE $\alpha$  y RE $\beta$  tiene secuencias primarias significativamente diferentes en sus DUH, por lo que es razonable que estos subtipos del RE unan a algunos ligandos con diferente afinidad y que

sus ligandos tengan también diferentes caracteres de agonismo o antagonismo mediado por los dos receptores. Debido a que ambos receptores tienen coincidencias pero también diferencias en su distribución tisular (Kuiper et al., 1996; Mosselman et al., 1996; Kuiper et al., 1997), así como diferencias en la interacción del ligando o actividad con los dos REs esto podría traducirse en diferencias importantes en sus acciones biológicas a nivel de tejido.

La distribución de los RE $\alpha$  y RE $\beta$  en los tejidos se ha estudiado. Estudios de hibridación *in situ* de RE $\beta$  en la próstata de rata y el ovario de ratón, han señalado que las células de la granulosa en el ovario de rata también expresan RE $\beta$  (Kuiper et al., 1996). Los ratones hembra knock out sin RE $\alpha$  son infértiles ya que no desarrollan úteros y ovarios normales, expresando el RE $\beta$  en los ovarios de estos ratones knock RE $\alpha$ , la funcionalidad no se restablece, aparentemente el RE $\alpha$  regula la expresión del RE $\beta$ , por lo tanto en ausencia de RE $\alpha$ , disminuye la regulación del RE $\beta$ . Lo que es particularmente interesante es el hecho de que hay muy altos niveles circulantes de E<sub>2</sub> en el ratón knockout RE $\alpha$ . Esto se ha atribuido a interacciones con RE $\beta$  para producir los estados patológicos observados en los ratones.

La presencia de dos diferentes REs podría explicar el mecanismo en el sitio blanco específico con antiestrógenos o las diferencias de FAs transcripcionales sobre genes de respuesta a estrógenos. Aunque las regiones conservadas de estos dos REs son amplias, existen varias regiones no conservadas las cuales probablemente den lugar a las diferencias observadas entre RE $\alpha$  y RE $\beta$ .

#### **4.2 PROTEÍNAS ASOCIADAS RECEPTOR-ESTRÓGENO**

Muchas proteínas asociadas al RE pueden jugar un papel importante en la interacción de diferentes ligandos. Halachmi y colaboradores (1993) han descrito una proteína asociada al RE de 160 kDa (PARE160) que se une al RE en presencia de estrógeno. Esta interacción es dependiente de E<sub>2</sub> y permite que el RE active la transcripción de genes de respuesta a estrógeno. Así, existe una correlación directa entre la habilidad del RE para unir PARE160 y su potencial de activación de transcripción. Los antiestrógenos no promueven la unión de PARE160 al RE y, de hecho, pueden inhibir la interacción dependiente de estrógeno de una manera dependiente de la dosis. Se ha propuesto recientemente que el complejo coactivador RE, el cual consiste de una interacción entre enlace agonista RE y PARE160 produce la captura del coactivador transcripcional p300 (Hanstein et al., 1996). Esto señala un mecanismo celular complicado de la interpretación del estrógeno como un agonista y los antiestrógenos como antagonistas.

### 4.3 ELEMENTOS DE RESPUESTA A ANTIESTRÓGENOS.

Cuando un antiestrogeno se une al DUH del RE, esto da como resultado un cambio conformacional en la proteína receptora. La conformación inducida por el antiestrogeno puede ser capaz de unirse específicamente a un elemento de respuesta de antiestrogeno y activar o inactivar la transcripción del gen. Este fenómeno se ha descrito recientemente para el raloxifeno en cultivo de células óseas (Yang et al., 1996). Este antiestrógeno muestran especificidad en sitio blanco similar al tamoxifeno y mantiene la mineralización ósea, siendo capaz de activar la transcripción de TGF $\beta$ 3 el cual está involucrado en la remodelación del hueso (Jordan et al., 1987). El E<sub>2</sub> activa discretamente la transcripción de este gen, pero el raloxifeno es aparentemente el ligando preferido. El mecanismo de acción del raloxifeno es mediado por promotores y es dependiente del RE. El elemento de respuesta a raloxifeno (ERR) que se ha descrito muestra una secuencia de polipurinas la cual no requiere DUD del RE para activar la transcripción del gen TGF $\beta$ 3. Así, debido a la unión raloxifeno RE y su independencia de DUD, se ha postulado que la interacción del RE unido a raloxifeno requiere una proteína adaptadora.

Yang y colaboradores (1996) usaron análisis delecional para identificar la secuencia ERR específica en la región del promotor de TGF $\beta$ 3. Se han encontrado ERR en los promotores de otros genes incluyendo: el gen activador de plasminógeno tipo urocinasa, el gen osteonectina, la proteína asociada al crecimiento específico de neuronas (GAP-43) y el protooncogene c-myc. Todos estos genes son regulados por estrógenos y codifican proteínas importantes en hueso, sistema nervioso central y sistema cardiovascular. Sin embargo, recientemente Yang y colaboradores (1997) consideran que el evento es mucho más complejo. Se ha identificado otro promotor transcripcional dependiente del RE que consiste de una nueva subclase de Alu DNA (Norris et al., 1996) que puede producir respuestas estrogénicas en células de mamíferos. Estos elementos funcionan como ERE clásicos debido a que además de responder a estrógenos, la actividad transcripcional es atenuada por los antiestrógenos. Por lo tanto una nueva clase de elementos de respuesta, elementos de consenso Alu debe ser considerada, cuando se analicen los genes de respuesta a estrógenos.



#### 4.4 REGULACIÓN DE LOS RECEPTORES DE ESTRÓGENO

Habiéndose establecido las condiciones de cultivo celular de células MCF-7, fue posible estudiar la regulación de RE en este tipo celular que tiene la ventaja de ser un cultivo de corto tiempo para determinar los efectos de estrógenos exógenos y antiestrógenos sobre la dinámica de su receptor.

La regulación de la expresión del RE en las células de cáncer de mama humanas es un proceso complejo y multifacético que varía entre los diferentes tipos celulares y es también diferencialmente regulado por estrógenos y antiestrógenos. Actualmente, han sido propuestos dos modelos de regulación del RE para explicar como los estrógenos y antiestrógenos dirigen la expresión del RE en células de mama T47D y células MCF-7 (Pink y Jordan, 1996).

**Modelo I.** En células MCF-7, la respuesta celular al tratamiento con estrógenos o antiestrógenos está definido por disminución de la regulación de la expresión del RE en el RNAm y el nivel de proteínas. Sin embargo, el antiestrogeno agonista parcial 4-OHT no tiene efecto sobre los niveles de RNAm pero causa una acumulación neta de proteína RE por estabilización. El antiestrogeno puro ICI 182,780 produce una reducción marcada en los niveles de proteína RE pero no tiene efecto sobre los niveles de RNAm. Así cada uno de estos compuestos tiene un efecto muy diferente sobre la expresión del RE al nivel de proteína y de RNAm.

**Modelo II.** La línea celular T47D exhibe otro modelo de regulación, donde ocurre un incremento en la expresión de RNAm y mantenimiento de los niveles de proteína RE con el tratamiento de estrógeno. El tratamiento con 4-OHT, induce efectos modestos sobre los niveles del RE y RNAm. Por otro lado, ICI 182,780 causa una marcada reducción en los niveles de proteína RE y de los niveles de RNAm.

La regulación transcripcional del RE en cáncer de mama es complicada; sin embargo, ha habido avances en el entendimiento del mecanismo involucrado. El control de la expresión del RE permite a la célula incrementar o disminuir los niveles del RE de acuerdo al requerimiento de supervivencia. La regulación de la expresión del RE juega un papel importante en el estadio de progresión celular del tumor. El descubrimiento de los mecanismos para la regulación o reactivación del receptor pueden ser valiosos como un blanco terapéutico que permitan el mantenimiento de la sensibilidad a antiestrógenos.

Se han postulado varias teorías para explicar el mecanismo de especificidad del sitio blanco. En el nivel subcelular, es posible observar la localización del sitio blanco de diferentes moléculas receptoras o la comunicación entre diferentes células conteniendo diferentes receptores en un tejido. Lo más probable es que el nuevo RE $\beta$  tenga especificidad del sitio blanco.

Recientemente Paech y colaboradores (1997) han sugerido dos vías potenciales para la acción de antiestrógenos. La vía convencional que ocurre vía RE $\alpha$  donde el E $_2$  activa los EREs y el antiestrogeno bloquea la activación ocupando el dominio de unión al E $_2$ . La segunda vía ocurre cuando el complejo antiestrogeno RE $\beta$  se forma (vía interacciones proteína-proteína) a AP-1 para activar los genes de respuesta a estrógeno en un sitio AP-1.

Adicionalmente hay datos que apoyan otras dos teorías para explicar la especificidad del sitio blanco de los antiestrógenos. La primera teoría postula que las diferentes células pueden tener diferentes ambientes intracelulares que determinan si un antiestrogeno es percibido como un agonista o un antagonista (Berry et al., 1990). La segunda teoría señala que podría haber EREs específicos en las regiones promotoras de los genes que interactúen con el complejo RE-tamoxifeno alterado. También es posible que la secuencia y el número de EREs en un promotor particular podrían tener un efecto como el antiestrogeno es percibido (Catherino y Jordan, 1995). Para complementar esta teoría un elemento de respuesta a antiestrógenos se ha identificado como sitio alternativo para la activación de un gen específico.

---

## 5. ANTIESTRÓGENOS

Los antiestrógenos se han clasificado en dos grupos principales: Análogos relacionados estructuralmente con tamoxifen (tipo I) los cuales producen acciones estrogénicas/antiestrogénicas en ensayos de laboratorio, y antiestrógenos puros (tipo II) que no producen efectos estrogénicos en los ensayos de laboratorio.

**Tipo I.** La estructura de trifeniletileno del tamoxifeno y el hallazgo de que éste se metaboliza a 4 hidroxil tamoxifeno (4-OHT) compuesto muy potente como antiestrogeno han sido las bases para el desarrollo de nuevos análogos que se están evaluando en la clínica. (figura 9; Jordan et al., 1977).

Toremifeno o clorotamoxifeno, el droloxifeno o 3-hidroxitamoxifeno se investigaron como agentes antiestrógenicos y antitumorales en el laboratorio y se han utilizado para el tratamiento de cáncer de mama avanzado y como terapia adyuvante (figura 9; Rausching y Pritchard, 1994; Hasman et al., 1994).). El interés de estos compuestos radica en que carecen de efectos carcinógenicos ya que no forman aductos de DNA, ni producen tumores hepáticos en ratas

La sustitución de halógenos en la posición 4 del tamoxifeno reduce la potencia antiestrogénica pero a su vez previene la conversión a 4-OHT (Allen, 1980) y la desmetilación de la cadena que produce la formación hepática de formaldehído. El Idoxifeno es un 4-iodopirrolidino derivado del tamoxifeno que tiene propiedades antiestrogénicas y antitumorales en animales de laboratorio (Chander, 1991) es metabólicamente estable, y fue sintetizado para eliminar la toxicidad hepática que causa el tamoxifeno en ratas (figura 9).

TAT-59 es un pro-fármaco del tamoxifeno que se desarrolló para el tratamiento del cáncer avanzado de mama (figura 9). TAT-59 inhibe el crecimiento del REs positivos en carcinomas mamarios de rata inducidos por dimetilbenzaustraceno (DMBA). El fármaco es activado metabólicamente a una forma desfosforilada que se une con alta afinidad al RE. El droloxifeno, o 3- hidroxitamoxifeno, ha sido estudiado extensivamente como un antiestrogeno y un agente antitumoral en el laboratorio (figura 11, Hasman et al., 1994). Este fármaco no forma aductos de DNA bajo condiciones de laboratorio y no produce tumores hepáticos en ratas (Hasman et al., 1994). Pruebas clínicas han mostrado su actividad en el tratamiento del cáncer de mama avanzado en pacientes posmenopáusicas (Rausching y Pritchard, 1994).

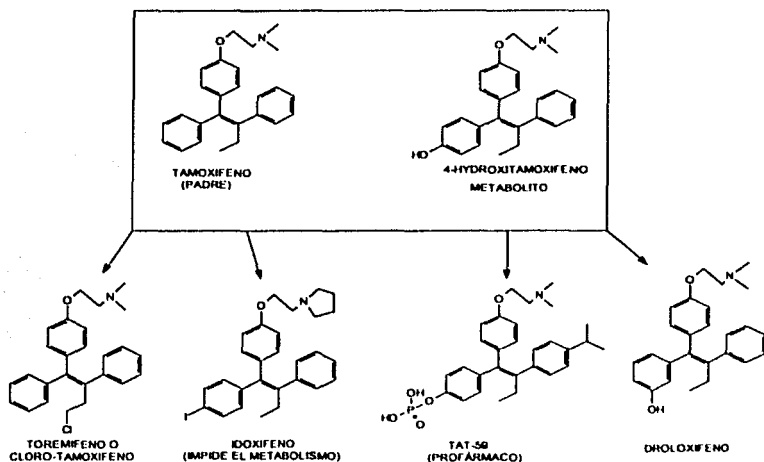


Figura 9. Tamoxifeno y Análogos.

**Tipo II.** Los antiestrógenos puros fueron descubiertos por Wakeling y colaboradores en 1987. El compuesto prototipo ICI 164,384 es un derivado  $7\alpha$  sustituido de  $E_2$  que carece de propiedades estrogénicas detectables *in vivo* o *in vitro* (Wakeling et al., 1994). Estudios de relación estructura actividad han establecido: que la sustitución  $7\beta$  es inefectiva en producir actividad antiestrogénica y la longitud de la cadena de carbonos determina la actividad óptima (Figura 10; Bowler et al., 1989). El compuesto ICI 182,780 es más potente que ICI164,384 y su evaluación clínica esta en proceso.

El descubrimiento de estos fármacos como antiestrógenos puros (ICI 164,384 y ICI 182,780) ha estimulado su estudio con el fin de mejorar su biodisponibilidad ya que ambos son poco solubles y tienen baja actividad por vía oral y su aplicación clínica podría lograrse mediante depósitos en inyecciones intramusculares.

El RU 58,668 es un compuesto derivado del estradiol sustituido en la posición  $11\beta$  con una larga cadena lateral hidrofóbica (figura10; Van de Velde, 1994,1996). Su evaluación *in vivo* e *in vitro* han demostrado que RU 58,668 tiene propiedades de un antiestrogeno puro (Van de Velde et al., 1994,1996).

El compuesto EM-139 es un inhibidor de la enzima 17-hidroxiesteroide deshidrogenasa y un antiestrogeno (figura 10; Li et al., 1995). Este compuesto fue desarrollado teniendo como objetivos no es solamente bloquear los REs sino también reducir la conversión de estrona a  $E_2$ , en pacientes postmenopáusicas. Esta idea surgió de la observación de aumentos significativos en la producción de  $E_2$  en las mujeres posmenopáusicas, este enfoque es interesante debido a que puede dar lugar a un bloqueo más eficiente del RE. También se ha planteado la posibilidad de un bloqueo más eficaz con la asociación de un antiestrogeno y un inhibidor de la aromatasa.

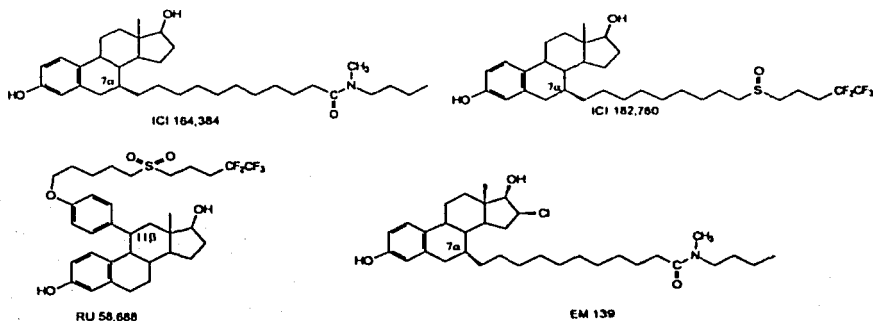


Figura 10

### 5.1 DIFERENCIAS ENTRE ANTIESTRÓGENOS *IN VIVO* E *IN VITRO*

La supresión de estrógenos es una de las estrategias principales de tratamiento para el cáncer de mama. Lippman y Bolan (1976) demostraron que la respuesta en presencia de RE-positivos en la línea MCF-7 podía ser inhibida por el antiestrogeno tamoxifeno, y este efecto podía ser revertido mediante la adición de  $E_2$ . El estrógeno solamente causa crecimiento de células MCF-7 en animales atímicos y no *in vitro*, entonces se propuso que era necesario un segundo mensajero hormonal *in vivo* para estimular el crecimiento. Esto se apoyó en datos de  $E_2$  y prolactina que eran requeridos para el crecimiento de tumores mamarios de rata inducidos por dimetilbenzantraceno. DMBA

También Lippman demostró que las células ZR-75 respondían al E<sub>2</sub> en un medio definido y se estableció un modelo reproducible de síntesis de prolactina inducida por estrógenos en cultivos celulares de tumores primarios. Este modelo fue utilizado para estudios de relaciones estructura química-actividad biológica de numerosos antiéstrógenos. Sin embargo, en los experimentos de cultivo celular los estrógenos y antiéstrógenos no producían efectos reproducibles aún después de la eliminación de todos los estrógenos en el suero para cultivo con carbón dextrán.

Más tarde se descubrió que la presencia de concentraciones micromolares del indicador de pH, rojo de fenol (figura 11), en el medio de cultivo celular interfería con la evaluación de los estrógenos. En estas condiciones las células de cáncer de mama crecían por estar en un medio completamente estrogenizado, así los estudios de acción de estrógenos exógenos y supresión de estrógeno eran imposibles. El efecto estrogénico estaba siempre presente, la respuesta de crecimiento en presencia de E<sub>2</sub> es tan exquisitamente sensible que menos de 10<sup>-10</sup> M producen los efectos máximos. Las concentraciones en las curvas de respuesta que se extienden entre 10<sup>-12</sup> y 10<sup>-10</sup> M está dentro del rango más bajo de niveles circulantes de estrógeno en las mujeres postmenopáusicas e incluso más allá del rango de radioinmunoensayos de rutina. En contraste la sensibilidad de replicación de estimulación de estrógeno, que induce la síntesis del receptor de progesterona o de prolactina requiere diez veces más del estrógeno.

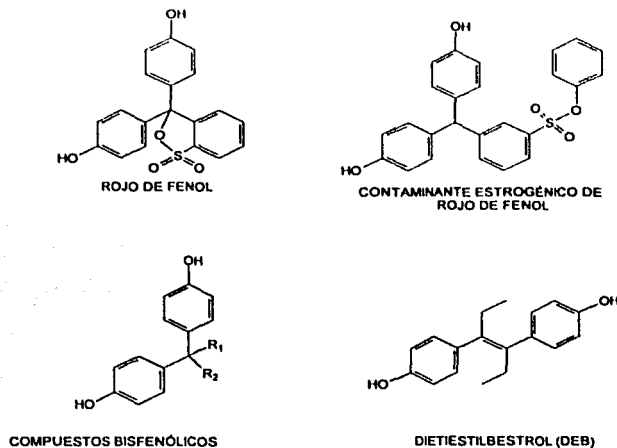


Figura 11

La estructura de rojo de fenol guarda relación con los estrógenos originalmente sintetizados por Sir Charles Dodds en los años 1930s (figura 11; Dodds y Lawson, 1936) y mimetiza los efectos uterotróficos de los estrógenos naturales. El retiro del indicador rojo de fenol del medio de cultivo cambió dramáticamente la respuesta de las células MCF-7 a los estrógenos exógenos y antiestrógenos. El E<sub>2</sub> produjo un enorme incremento en la respuesta de crecimiento de línea celular de cáncer de mama. Se identificaron REs en el cultivo, los antiestrógenos competitivamente inhibían el crecimiento estimulado por estrógeno y exhibían acciones de agonistas parciales. Se establecieron condiciones convirtiendo a estas células en un modelo propuesto para la evaluación de las propiedades estrogénicas de xenobioticos (Berthois et al., 1986).

Es interesante saber que el rojo de fenol no produce efectos estrogénicos. Diferentes lotes de rojo de fenol provenientes de diferentes manufactureros tenían diferentes niveles de estrogénicidad (Welshons et al., 1988), J y B Katzenellenbogen demostraron que el rojo de fenol solo no era el responsable de la estrogénicidad observada. Aislaron el contaminante, un producto de dimerización de los componentes utilizados durante la síntesis del rojo fenol (figura 11), que es un potente estrógeno.

El descubrimiento de un contaminante estrogénico en el indicador rojo fenol es análogo al problema de investigación encontrado en los 1930s. Donde el Lanol, (figura 11), se reportó que poseía una actividad estrogénica extremadamente potente, pero se descubrió que el anol a dianol como impureza, era la responsable de las propiedades estrogénicas observadas.

## 5.2 RELACIONES ESTRUCTURA-ACTIVIDAD

Dofman y Kinel (1966) utilizando a la estrona como estándar y el efecto uterotrópico en ratón inmaduro determinaron la actividad estrogénica de análogos de estrona: 3-, 17-desoxi, y/o alquilderivados. El incremento de la actividad por vía oral del derivado 17 -etinil fue confirmada. Las sustituciones alquílicas de metilo en el carbono 2, alquilo en el carbono 4 o metileno en el carbono 16, disminuyen la actividad estrogénica (figura 12). El estra-1,3,5(10)-trieno tiene una potencia muy baja como estrógeno. El hidroxilo fenólico del carbono 3 es la sustitución más importante para que se lleve a cabo la unión con el RE (figura 12).

El DEB tiene una alta afinidad de unión al RE. Las afinidades de unión relativas de varios compuestos se muestran en la figura 13 al análogo del ciclopropilo (compuesto 15; figura 13) es el más relacionado con el DEB, con baja afinidad de enlace para el receptor, un anillo de tres miembros que contienen oxígeno tiene afinidad de enlace relativa=80 (compuesto 12; figura 13).

La sustitución del ciclopropil derivado con dos cloros incrementa la afinidad relativa de enlace (compuesto 13; figura 13), y, como se observó previamente, la sustitución de los fenoles con grupos acetilo disminuye la afinidad relativa de enlace (compuesto 14; figura 13). Una observación biológica interesante de estos compuestos es que todos ellos son estrógenos de diferente potencia excepto el compuesto 11 (figura 13), el cual es un antiestrogeno débil en el ratón.

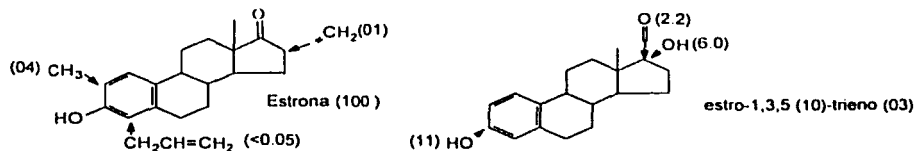


Figura 12.

La relación estructura actividad de compuestos fenólicos derivados de plantas ha sido comparada con los estrógenos sintéticos. En la figura 14, se muestra la potencia de varios compuestos que fue determinada mediante la dosis oral mínima requerida para producir un peso uterino de 20 mg (control=10 mg) en el ratón inmaduro. Como es de esperarse, la diacetilación no afecta la potencia del dietilestilbestrol administrado por vía oral. El  $\Delta$ -3-isoflaveno (compuesto 18; figura 14) tiene una potencia muy baja.

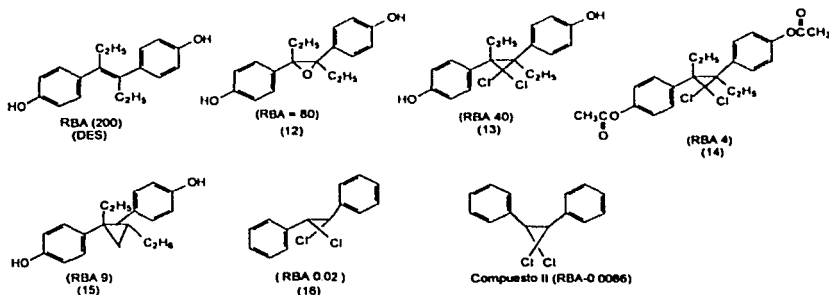


Figura 13.



Es interesante notar que las isoflavonas y cumarinas (compuestos 19 a 22; figura 14) muestran un amplio rango de potencias. La baja potencia del compuesto 21 (figura 14) aumenta por la inserción de un puente de oxígeno dando lugar al cumestrol. La acetilación del cumestrol para formar el compuesto 19 no disminuye significativamente la actividad. La sustitución del compuesto 21 (figura 14) con un grupo n-propil incrementa la potencia de 37mg a 0.1mg, pero la introducción del grupo setoxi incrementa la potencia hasta 0.031mg. Esto puede ser debido a un efecto farmacocinético al incrementar la lipofilicidad e incrementar la vida media biológica evitando una rápida conjugación. La isoflavanona, daidzeína (compuesto 24; figura 14), tiene una baja potencia del mismo orden que la isoflavanona 25.

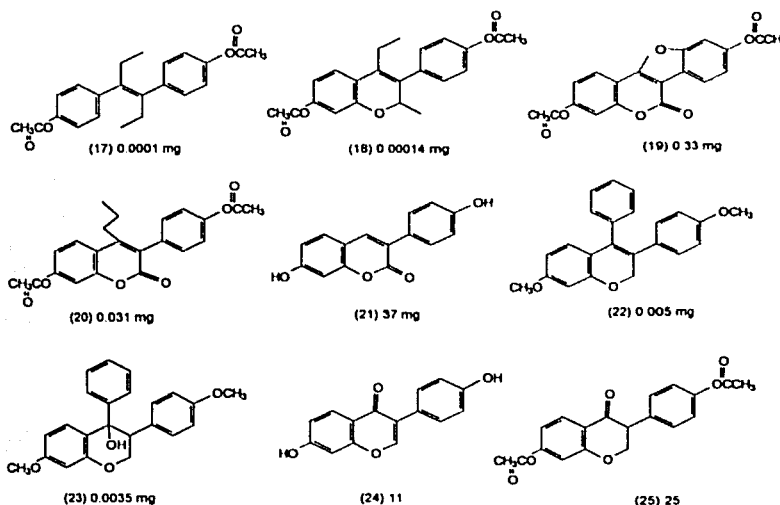


Figura 14. Relación estructura-actividad de fitoestrogénos.

Los derivados del trifeniletileno sustituidos han sido estudiados *in vivo* (Enmens, 1947). La potencia puede ser mejorada por medio de hidroxilos localizados estratégicamente, y la duración de la acción puede ser incrementada con derivados de éteres de alquilo. La observación más interesante, es que una cadena lateral de aquilaminoetoxi localizada estratégicamente puede producir tanto acciones agonistas como antagonistas.

La pérdida de los grupos acetilos y la sustitución de un fenol con una cadena lateral de pirrolidinoetoxi produce un antagonista de estrógeno. Este principio esta ejemplificado en los isómeros *cis*, ICI 47,699 y el zuclomifeno siendo ambos estrógenos (figura 15).

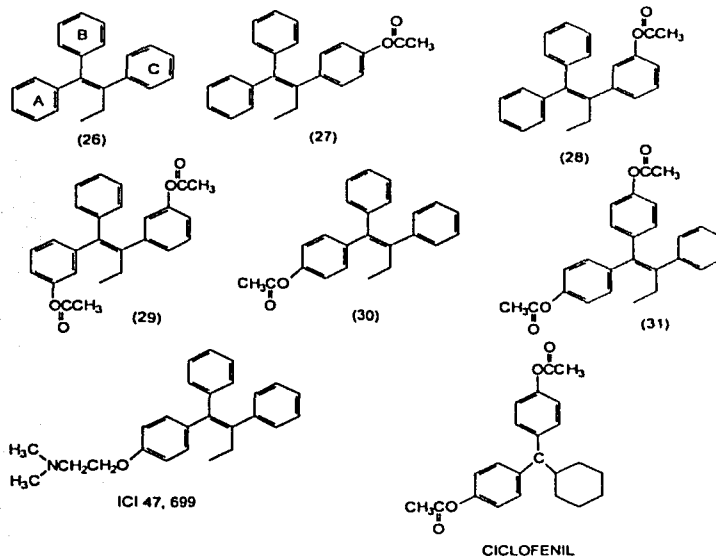


Figura 15. Estrógenos noesteroidales.

### RELACIÓN ESTRUCTURA-ACTIVIDAD *IN VITRO*

El modelo inicialmente descrito de la interacción del ligando con el receptor de estrógenos y antiestrógenos esta basado en las características estructurales necesarias para iniciar o inhibir la síntesis de prolactina en células de pituitaria de rata. La interacción del E<sub>2</sub>-17β con un sitio de unión hipotético en el RE inicia la interacción fármaco-receptor que da como resultado la estimulación o inhibición de la síntesis de prolactina (figura 16).

Los compuestos que tienen isómeros geométricos *cis* y *trans* son muy importantes para el desarrollo de un modelo ligando-receptor porque las moléculas isoméricas poseen propiedades estrogénicas y antiestrogénicas. Los estudios *in vivo* no pueden excluir la posibilidad de que los isómeros *cis* (zuclomifeno o ICI 47,699) se metabolicen a estrógenos en el hígado antes de unirse a los tejidos blanco, sin embargo el zuclomifeno y el ICI 47,699 son estrógenos *in vitro* (Lieberman et al., 1983).

La interacción de los isómeros geométricos del tamoxifeno con el receptor de estrógenos se describe en la figura 16. Los ligandos estrogénicos, zuclomifeno y ICI 47,699, con su baja afinidad por el receptor, pueden crear una estructura *trans* similar al estilbena con el anillo para-fenil sustituido. En este estado de unión, la cadena lateral aminoetoxi debería estar cerca del sitio fenólico del receptor con una débil interacción con el oxígeno del éter (UBA). No hay interacción de la cadena lateral con la región antiestrogénica, y como resultado, se impide la acción antiestrogénica.

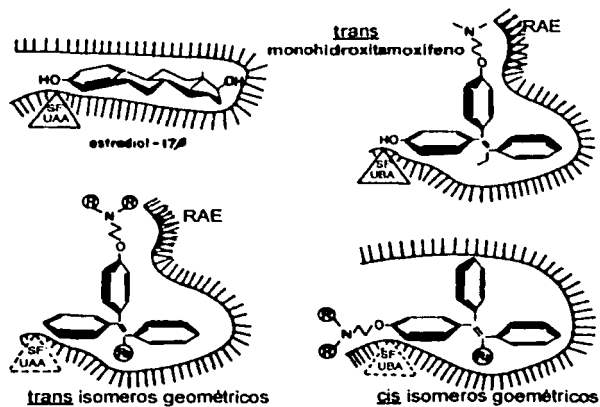


Figura 16. Modelos hipotéticos de  $E_2$ , tamoxifeno y 4OH-tamoxifeno (RAE: Región antiestrogénica, SF: sitio fenólico, UAA: Unión de Alta Afinidad, UBA: Unión de Baja Afinidad).

Con este modelo se llevó a cabo un estudio de los trifeniletilenos (figura 15), donde los anillos son marcados A, B y C. Las afinidades de unión relativas de los compuestos se muestran en la figura 17. El trifenilbuteno no sustituido (compuesto 26; figura 15) tiene la afinidad más baja por el receptor pero las sustituciones de los anillos A y C mejoran altamente la afinidad. El compuesto 30 (figura 15) con acetilo en la posición equivalente del 3-hidroxi-fenólico del  $E_2$  fue el

estrógeno mas activo y los compuestos sin sustituciones en el anillo B fueron todos estrogénicos *in vitro* con una potencia directamente relacionada a sus afinidades de unión relativas.

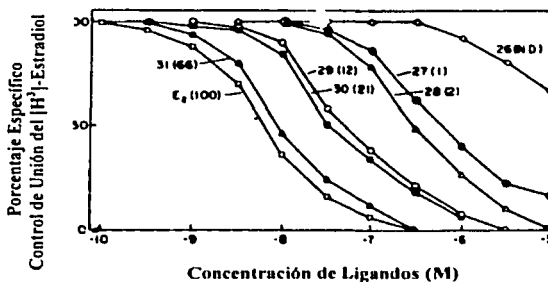


Figura 17. Inhibición de diferentes trifeniletílenos sobre la unión de [<sup>3</sup>H] E<sub>2</sub> en el receptor de estrógenos en útero de rata.

El compuesto 31 (figura 15) se une a el receptor con una alta afinidad, pero es completamente antiestrogénico *in vitro*. La cadena lateral del aminoetoxi no es la única sustitución en el anillo B que previene la acción del estrógeno. La pérdida de los grupos acetilos para dar compuestos bisfenólicos, producen agonistas parciales *in vitro* y efectos antagonistas.

Un agonista se une al receptor y produce una perturbación conformacional específica (PCE) y, como resultado, el complejo tiene una eficacia intrínseca de 1. Un antagonista se une al receptor para producir una perturbación conformacional no específica (PCNE) y un complejo con una eficacia intrínseca de cero. Un agonista parcial se une a un receptor y produce una mezcla de complejos receptor agonista y antagonista (figura 18).

### 5.3 MECANISMOS DE ACCIÓN DE ANTIESTROGENOS

El modelo molecular actual de la acción de los estrógenos tiene varios puntos débiles que pueden ser analizados con los antiestrogénos (figura 19). Como se describió previamente, los antiestrogénos pueden ser divididos en dos categorías principales basados en su mecanismo de acción. Los antiestrogénos **tipo I** que son los análogos de tamoxifeno o derivados estructurales del tipo del trifeniletileno. Los **tipo II** son los antiestrogénos puros. Todos los compuestos son inhibidores competitivos de la unión de E<sub>2</sub> con el RE. Los antiestrogénos tipo I parecen formar un complejo con el receptor que es convertido de manera incompleta a la forma totalmente activada (McDonnell et al., 1995). Como resultado de estos cambios imperfectos en la estructura terciaria

de la proteína, el complejo es solamente parcialmente activo al iniciar la serie programada de eventos necesarios para comenzar la activación de genes.

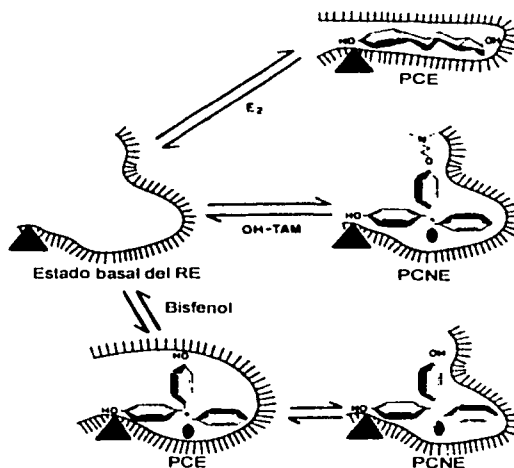


Figura 18. La teoría de la perturbación macromolecular de Bellau's describe la interacción de: el agonista, antagonista y agonista parcial en el RE. Los grupos fenólicos en el ligando interactúan con el sitio fenólico (cierre del triángulo) en el RE y producen un aumento en la afinidad de interacción. El E<sub>2</sub> (agonista) induce una perturbación conformacional específica (PCE) mientras que el 4-hidroxitamoxifeno (OHTAM antagonista) solo induce una perturbación conformacional no específica (PCNE). El bisfenol (agonista parcial) produce una mezcla de PCE y PCNE en el RE.

Estudios *in vitro* han demostrado que muy bajas concentraciones de los antiestrógenos del tipo I pueden causar replicación en las células de cáncer de mama, pero altas concentraciones de estos antiestrógenos son completamente inhibitorias debido a su modesta acción agonista.

Los antiestrógenos puros previenen la dimerización del complejo receptor y la unión a los EREs, por lo tanto los genes no son activados. Sin embargo, numerosos reportes (Pinky y Jordan, 1996) han demostrado que los complejos antiestrógeno puro RE pueden unirse a los EREs pero la unidad transcripcional es inactiva. La característica de los antiestrógenos tipo II es que ellos provocan la destrucción del RE en las células de cáncer de mama en cultivos de útero y tumores de mama *in situ* de ratón. El RE es sintetizado en el citoplasma y transportado al núcleo donde funciona como un factor de transcripción, un antiestrógeno puro se une al receptor y previene el

transporte al núcleo. El complejo receptor paralizado entonces es destruido rápidamente. La completa destrucción de RE previene cualquier evento regulado por el estrógeno. Las células normales se volverán quiescentes, produciéndose una regresión tumoral debido a que rápidamente las células tumorales subsiguientes no pueden replicarse.

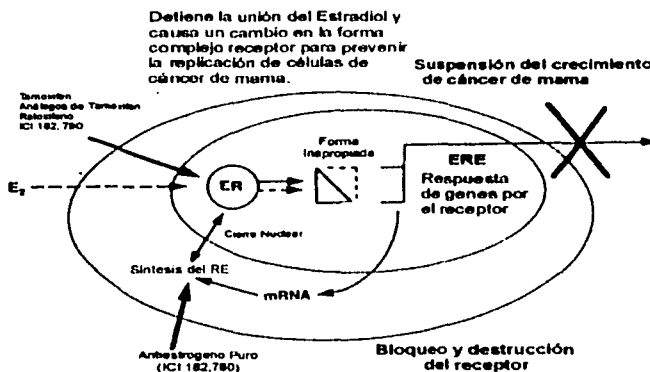


Figura 19. Modelo molecular actual de la acción de antiestrogénos. Los diferentes antiestrogénos actúan en diferentes eventos sobre el RE inhibiendo la señal de transducción.

#### 5.4 ANTIESTRÓGENOS Y EL CICLO CELULAR

La descripción molecular de las vías de señales de transducción para estrógenos y su modulación por antiestrogénos responderá cómo los complejos RE y R-AE cambian la replicación celular apagándola y prendiéndola.

Los primeros experimentos que ilustraron la conexión entre antiestrogénos y el ciclo celular mostraron que la incorporación de timidina en células de RE-positivos (Lippman y Bolan, 1975; Lippman et al., 1976). Estudios usando células sincronizadas demostraron que los antiestrogénos podían solamente inhibir el crecimiento de células que estaban en cerca de la mitad de la fase G1 del ciclo celular. Adicionalmente, Lykkesfeldt y sus colegas (1984) estudiaron los efectos del tratamiento de tamoxifén sobre la cinética del ciclo celular de células MCF-7. Mostraron que después del tratamiento con tamoxifeno, las células no solamente se quedaban incorporadas en la fase G1, sino también en la fase G2 del ciclo celular.

Los estudios en dos líneas celulares de cáncer de mama MCF-7 y T47D proveen una valiosa visión sobre las consecuencias de la acción de estrógenos y antiestrógenos. Las células MCF-7 tratadas con antiestrógenos esteroidales y no esteroidales producen un decremento significativo en el RNA m de ciclina D1, lo que sugiere que la ciclina G1 podrían ser un blanco de los antiestrógenos para bloquear la entrada en la fase S. Estudios posteriores usando el antiestrogeno puro ICI 182,780 demostraron una reducción de la proporción de células en la fase S y un incremento en el Rb hipofosforilado y un incremento en la expresión de p27KIP1 y p21WAF1/CIP1 (Watts et al., 1995).

Efectos similares en el ciclo celular se observan en células humanas T47D de cáncer de mama. Los antiestrógenos reducen la expresión de la actividad de la ciclina D1 y el arresto en el ciclo celular ocurre en la fase G1 ( Wiken, 1996). Los niveles de RNA m y proteína de ciclina D3 o E, cdk2 y cdk4 no son afectados. Finalmente, el tratamiento con ICI 164,384 redujo la cantidad de Rb hiperfosforilada. Todos estos efectos de los antiestrógenos fueron revertidos por tratamiento con E<sub>2</sub>.

## 5.5 ANTIESTRÓGENOS Y FACTORES DE CRECIMIENTO

Durante los pasados 20 años, se han estudiado los mecanismos por medio de los cuales las células modulan su crecimiento o detienen su crecimiento. La identificación de familias de factores de crecimiento estimulatorios o inhibitorios que afectan a la misma célula (factores autócrinos) o a células adyacentes (factores parácrinos) han revolucionado los conceptos de regulación hormonal (Dickson y Lippman, 1995).

Se han estudiado los efectos de los antiestrógenos sobre la regulación de tres diferentes sistemas de factores de crecimiento: factor de crecimiento  $\alpha$  (FCT $\alpha$ ), factor de crecimiento  $\beta$  (FCT $\beta$ ), y factor de crecimiento tipo insulina (FCI). El FCT $\alpha$  y el FCI están modulados por E<sub>2</sub>, en contraste, el FCT $\beta$  consiste de una familia de tres proteínas independientes que son inhibidores del crecimiento.

### FACTOR DE CRECIMIENTO TIPO $\alpha$ (FCT $\alpha$ )

Los estrógenos incrementan la producción de FCT $\alpha$  y, de esta manera se produce una activación autocrina del receptor del factor de crecimiento epidermal, que estimula la replicación. Sin embargo, el FCT $\alpha$  solo no puede sustituir al estrógeno. Las células MCF-7 transfectadas con el DNA para FCT $\alpha$  no son tumorigénicas en ratones atímicos (Clark et al., 1989).

Los estudios de Wakeling y sus colaboradores realizados en 1988 compararon la habilidad del antiestrogeno puro, ICI 164,384 y el antiestrogeno parcial tamoxifeno y su metabolito activo, 4-OHT para inhibir los efectos estimulatorios de FCT $\alpha$  en las células MCF-7, demostrando que cuando estas células son tratadas con FCT $\alpha$ , ambos antiestrógenos bloquean el efecto estimulante en la ausencia de E $_2$ , siendo el ICI 164,380 más efectivo. En contraste, estudios utilizando EGF en lugar de FCT $\alpha$  mostraron que los antiestrógenos no podían bloquear las acciones de este factor de crecimiento y también no podían bloquear la influencia parácrina de las células RE-negativas. Además se conoce que los estrógenos pueden inducir la expresión de FCT $\alpha$  en líneas de células de cáncer de mama estrógeno dependiente, mientras que los antiestrógenos generalmente disminuyen la expresión de FCT $\alpha$  *in vitro* e *in vivo*. Existe un estudio que muestra que el tamoxifen es capaz de regular la expresión de FCT $\alpha$  de tumores de mujeres postmenopáusicas con enfermedad de RE y RP positivos pero no en tumores por enfermedades de mujeres RE y RP negativos.

#### FACTOR DE CRECIMIENTO TIPO $\beta$ (FCT $\beta$ )

La familia de polipéptidos inhibitorios FCT $\beta$  consiste de tres o más miembros diferentes de 25 kDa los cuales son capaces de homo o hetero dimerizarse para formar complejos que interactúan con el receptor de FCT $\beta$  (RFCT $\beta$ ). Estos péptidos están implicados en el cáncer de mama y se ha encontrado que están sobre expresados y correlacionados con la progresión del tumor (Gorsch, 1992). El FCT $\beta$  se une a cualquiera de los diferentes RFCT $\beta$  caracterizados. El receptor consiste de un complejo hetero dimérico, en la cual está unido a proteína de unión que es incapaz de señalizar y otra parte que se cree que transduce señales a la célula a través de una actividad de serina-treonina quinasa (Bützow y Attisano, 1993).

El tamoxifeno tiene un efecto directo sobre la producción de FCT $\beta$  en células de cáncer de mama. Algunos estudios reportan un incremento de FCT $\beta$ 2 con tamoxifeno (Jeng et al., 1993), mientras otros demuestran incremento en FCT $\beta$  1. Knabbe y colegas (1996) han mostrado que el tratamiento con antiestrogenos causa un incremento en FCT $\beta$ 1 vía camino no transcripcional y el incremento en FCT $\beta$ 2 ocurre a través de la activación transcripcional por FCT $\beta$ 1. Esta observación ha sido interpretada en la clínica como que los pacientes que responden a la terapia de tamoxifeno muestran incrementos en FCT  $\beta$ 2 y aquellos que no responden no muestran cambios en los niveles plasmáticos de FCT  $\beta$ 2. El estudio de Knabbe sugiere que los resultados de medir ya sea FCT $\beta$  1 o FCT $\beta$  2 en plasma (Kopp et al., 1995) pueden ser usados como ensayos predictivos para la eficacia de la terapia con tamoxifeno.



Algunos autores han propuesto que la respuesta a la terapia con tamoxifeno puede ser mediada a través de un incremento en la expresión de una iso-forma particular de FCT $\beta$ .

El efecto del tamoxifeno en los tumores RE negativos es controversial. Perry y sus colaboradores (1995) han comparado y contrastado el efecto del tamoxifeno sobre la inducción de FCT $\beta$  1 en líneas de célula RE positivo y RE negativo. Después de un tratamiento a largo plazo, la expresión de FCT $\beta$  1 se incrementó, independientemente del estado del RE, pero una acumulación de células en G1 / G0 y un incremento en la apoptosis ocurrió simultáneamente. Esta conclusión tiende a apoyar un modelo del efecto directo del tamoxifeno sobre células RE negativas.

Es posible que el crecimiento de una célula RE negativa esté controlado por un mecanismo parácrino. La célula RE positiva produce FCT $\beta$  en respuesta a tamoxifeno, pero el factor de crecimiento secretado detiene el crecimiento de las células RE negativas adyacentes (Knabbe et al., 1987). Se conoce que las células de cáncer de mama RE negativas tienen una alta densidad de RFCT $\beta$  y las células responden al FCT $\beta$  por inhibición de crecimiento (Jeng et al., 1993). La hipótesis de que una célula RE positiva puede controlar el crecimiento de células RE negativas durante la terapia de tamoxifeno se ha demostrado *in vitro*. Sin embargo, esto no ha sido posible probarlo en modelos animales.

El hallazgo en laboratorio de que el tamoxifeno puede inducir FCT $\beta$  en fibroblastos (Benson et al., 1996; van Roozendaal et al., 1995) ha introducido un abordaje mecanístico nuevo para entender el control de la enfermedad RE negativa por tamoxifeno. Si FCT $\beta$  induce el crecimiento en las células tumorales de cáncer de mama, durante la terapia de tamoxifeno, la inhibición del crecimiento parácrino podría controlar la proliferación de células RE negativas. A pesar de que estos datos ilustran una conversación celular para regular el crecimiento el hecho de que el tamoxifeno no es generalmente exitoso en enfermedad RE negativa significa que la vía no es dominante. El FCT $\beta$  puede actuar como un inhibidor o como un estimulante de crecimiento y esto puede explicar la falla del tamoxifeno.

### **FACTOR DE CRECIMIENTO TIPO INSULINA (FCI)**

Muchos experimentos han mostrado que el FCI es un potente estimulador de la proliferación de células de cáncer de mama. El FCI se une a receptores específicos sobre la superficie de la célula y también está asociado con proteínas de unión específicas de alta afinidad presentes ya sea en la circulación o extracelularmente. Una vez que estas proteínas de unión específicas de alta afinidad son secretadas, son capaces de modular la activación del receptor del

---

FCI. Las proteínas unidas a FCI (PUFCI) se están estudiando por su uso potencial en terapias de cáncer de mama como inhibidores del crecimiento.

El tamoxifeno puede tener un efecto regulador directo sobre el sistema FCI-1, pero los antiestrógenos pueden también modular el sistema FCI-1 diferencialmente en diferentes tejidos blanco. Los estrógenos inducen FCI-1 en el útero y se cree que son responsables de la respuesta uterotrópica observada en células estromales y epiteliales. El tamoxifeno también produce un efecto uterotrópico y duplica la expresión de FCI-1. En contraste, ICI 182,780 disminuye FCI-1 en su expresión y no tiene efecto uterotrópico.

Las acciones sobre tejidos blanco de antiestrógenos para reducir los niveles de FCI-1 podrían tener importantes implicaciones para la dispersión metastásica de células tumorales. FCI-1 facilita el crecimiento de células de cáncer de mama RE positivas y negativas, así la micrometastasis pueden encontrarse a sí mismas en un ambiente hostil sin el soporte paracrina de factores de crecimiento en los tejidos. Similarmente, el tamoxifeno disminuye los niveles circulantes de FCI-1 y causa una elevación de los niveles circulantes de PUFCI-1. La reducción de un potente mitógeno circulatorio podría reducir la tasa de crecimiento de ambos RE positivos y RE negativos.

## 5.6 MUTACIÓN DE RECEPTOR Y ANTIESTRÓGENOS

Las mutaciones en el RE han sido usadas para estudiar la farmacología de agonistas y antagonistas de estrógenos. Las mutaciones en el RE de ratón en residuos 525 y 521 / 522 pueden abolir la habilidad del RE para unir  $E_2$ , eliminando la transactivación. Los receptores mutantes retienen la respuesta agonista parcial del tamoxifeno de manera similar al RE tipo salvaje. Como se estableció anteriormente el RE contiene una región FA-1 y una FA-2. La actividad de FA-2 depende de la presencia de una  $\alpha$ hélice anfipática en los residuos 538 a 552 y cuando los residuos hidrofóbicos (543, 544, 547, 548) de esta región son mutados, la transactivación inducida por estrógenos se reduce mientras la función de unión a DNA no se afecta. La farmacología de antiestrógenos es afectada dramáticamente. Por ejemplo, tamoxifeno y ICI 164,384 actúan como agonistas en células RE negativas transfectadas con los RE mutantes. Estas mutaciones han sido sugeridas como promotores de la resistencia de tamoxifeno, sin embargo ninguna evidencia clínica o de laboratorio apoya esta idea.

El promotor también puede afectar la actividad transcripcional de FA-1 y FA-2 del RE. Esto ha sido demostrado en una serie de mutantes de RE humanos (Tzuckerman et al., 1994). Usando los RE mutados en los aminoácidos 538,542 o 545, se ha mostrado que la actividad antagonista

del tamoxifeno es resultado de su inhabilidad para activar la función de FA-2. Sin embargo, en ciertas situaciones, el tamoxifeno puede actuar como un agonista y activar eficientemente la transcripción. Si un promotor solamente requiere la función de FA-1 para activar la transcripción de genes, la unión a tamoxifeno puede ser suficiente.

McDonnell y colegas (1995) mostraron que las diferencias funcionales entre diferentes antiestrógenos dependen del tipo de célula y el contexto promotor. La habilidad de los antagonistas de RE para modular la actividad transcripcional se ha estudiado usando una mutante RE en la cual FA-2 ha sido inactivada. 4-OHT, raloxifeno, y ICI 164,384 presentaron todos los diferentes perfiles de activación transcripcional (McDonnell et al., 1995).

## 5.7 INTERACCIONES CON ELEMENTOS DE RESPUESTA A ESTRÓGENO

Las interacciones del RE con EREs también dependen de la naturaleza del ligando al cual están unidas. Cuando los efectos de la unión de ligandos estrogénicos y antiestrogénicos del RE son cuantificados, se halló que RE- E<sub>2</sub> y 4-OHT-RE se unen a un singulete de EREs con afinidad similar mientras ICI 164,384-RE no se une.

El mecanismo a través del cual los antiestrógenos antagonizan la transcripción de los genes de respuesta a estrógeno por medio de unión diferencial a EREs muestran que las secuencias flanqueantes y el estereolineamiento de los EREs son importantes (Anolik et al., 1996). Una nueva investigación de ligandos antiestrogénicos demostró que cuando 4-OHT-RE se une a DRB una molécula de 4-OHT se disocia a partir del dímero del RE. Bajo las mismas condiciones, tamoxifeno aziridina, la cual covalentemente se ancla al RE, mostró una estequiometría de unión idéntica con RE- E<sub>2</sub>, la cual es un receptor dimérico para EREs comparado con un monómero de 4-OHT-RE por EREs. Los resultados sugieren que el cambio de conformación inducido por ligandos afecta primariamente a la interacción del RE con los componentes del complejo de iniciación de transcripción mediando así la activación transcripcional.

## **6. BENEFICIO-RIESGO DE LA ADMINISTRACIÓN DE ANTIESTRÓGENOS**

Los antiestrógenos por sus acciones antitumorales en cáncer de mama tienen gran relevancia clínica. Sin embargo, la farmacología clínica de antiestrógenos es compleja y no puede ser descrita simplemente como un bloqueo de la acción de los estrógenos.

En 1985 el tamoxifeno fue aprobado por la Food and Drugs Administración (FDA) como adyuvante en las mujeres posmenopáusicas con cáncer de mama con REs positivos. En 1989, se obtuvo la aprobación de la FDA para el uso de tamoxifeno en el tratamiento de mujeres premenopáusicas con cáncer de mama avanzado con REs positivos. El tamoxifeno es también activo en el tratamiento del cáncer de mama de hombre, y en 1993, se aprobó la indicación para su uso en cáncer de mama avanzado en hombres. Su valor clínico se basa en que incrementa la supervivencia de pacientes con cáncer de mama.

### **6.2 FUNCIÓN ENDOCRINA DE ANTIESTRÓGENOS**

El tamoxifeno exhibe efectos tipo estrogénico en las pacientes posmenopáusicas causando una disminución parcial en las hormonas folículo estimulante y luteinizante (Jordan et al., 1987a), un incremento en las globulinas que unen a las hormonas sexuales, y un efecto mínimo sobre la antitrombina III. También causa un incremento en la estrona, E<sub>2</sub> y progesterona circulantes tras la ovulación (Jordan et al., 1991a). Las pacientes menores de 40 años de edad generalmente retienen sus ciclos menstruales después de la quimioterapia, mientras que las pacientes entre 40 y 50 años de edad cesan su menstruación tras la quimioterapia. El tamoxifeno produce incremento en los niveles de esteroides en pacientes que retienen la función menstrual, pero en aquellas pacientes que se vuelven menopáusicas, el efecto de tamoxifeno es el de un estrógeno débil. Este medicamento ha sido efectivo en pacientes premenopáusicas con enfermedad avanzada. Estudios de laboratorio en ratones albinos han demostrado que niveles bajos circulantes de tamoxifeno no pueden controlar niveles de estrógenos extremadamente altos, produciéndose falla del tratamiento, sin embargo la ooforectomía puede mejorar la respuesta (Sawka et al., 1986).

### **6.1 CÁNCER DE MAMA**

Las mujeres con diagnóstico previo de cáncer de mama tienen incrementado 3 veces el riesgo de desarrollar cáncer de mama contralateral comparadas con mujeres de la misma edad sin el padecimiento (Boring et al., 1994). Estudios desarrollados en un total de cerca de 15000

mujeres han demostrado que la incidencia de tumores de mama contralaterales en mujeres que reciben tamoxifeno se reduce en 36% (tabla 1; Bilimoria et al., 1996a). A pesar de las variaciones debidas a la menopausia y la enfermedad, así como la duración y la dosis de tamoxifeno, los efectos quimiosupresivos y quimiopreventivos del tamoxifeno han sido muy evidentes.

Los tratamientos más largos con tamoxifeno producen una mejor respuesta con respecto a tratamientos más cortos. Las mujeres que tomaron tamoxifeno por menos de dos años tenían solamente un 26% de reducción del cáncer de mama contralateral, mientras que la reducción es del 54% en mujeres de más de dos años de tratamiento.

TABLA 1

Frecuencia contralateral de cáncer de mama en pacientes con terapia adyuvante de tamoxifeno comparado con un control <sup>a)</sup>

Prueba clínica	Estudio menopausico	Pacientes tratados con tamoxifeno		Controles	
		Numero de Pacientes	Numero de cáncer	Numero de Pacientes	Numero de cáncer
NATO, 1985 <sup>b</sup>	Pre y post	564	15	567	17
Stewart et al., 1992	Pre y post	661	9	651	12
Rutqvist et al., 1987	Post	931	18	915	32
Pritchard et al., 1987	Post	198	3	202	3
Cummings et al., 1986	Post	91	1	90	3
Fisher et al., 1989	Pre y post	1419	23	1428	32
CRC, 1988	Pre y post	94	7	965	18
Andersson et al., 1992	Post	864	10	846	8
Ryden et al., 1992	Post	239	11	236	15
Mason et al., 1993	No indicado	367	4	1980	57
Total		6281	101	7880	197
			1.6%		2.5%

<sup>a)</sup> La incidencia de cáncer de mama contralateral en 15,000 mujeres que recibieron terapia con tamoxifeno (adaptado por Nayfield et al., 1991). <sup>b)</sup> NATO = Organización de la prueba con Novaldex; CRC = Cáncer Research Campaign.

### 6.3 ANTIESTRÓGENOS EN HUESOS Y LÍPIDOS

Estudios experimentales *in vitro* e *in vivo* han demostrado inhibición de la resorción ósea con tamoxifeno. Así mismo los efectos sobre la resorción de hueso en pacientes que han recibido

terapia de tamoxifeno han sido demostrados en numerosos estudios y se presentan en la tabla 2 (Bilimoria et al., 1996a). Este efecto se observa en pacientes tratados con tamoxifeno por 2 a 5 años. Estos estudios también notan preservación de hueso trabecular en el cuello femoral, un sitio común de fracturas osteoporóticas postmenopáusicas. En contraste, Powles y colaboradores (1996) han mostrado una ligera, pero significativa disminución en la densidad del hueso de mujeres premenopáusicas tratadas con tamoxifeno efecto esperado como una expresión de los efectos antiestrogénicos del tamoxifeno, sin embargo el impacto total sobre el posterior desarrollo de osteoporosis es desconocido. Es interesante hacer notar que la administración de bifosfatos para el desarrollo de huesos no se afecta por la terapia antiestrogénica en pacientes posmenopáusicas (Saarto et al., 1997).

TABLA 2  
Contenido mineral del hueso en mujeres con tratamiento de tamoxifeno contra controles \*

Estudio	Duración del Tamoxifeno (años)	Área de estudio	Estudio diseñado	Control	Grupo tratado con tamoxifeno	Significancia estadística
Golfredsen et al., 1984	1	Radio distal	Cambio en BMD <sup>b</sup> (g/cm <sup>2</sup> )	-2.5%	-3.2%	NS
Fornander et al., 1990	2	Radio proximal	BMD (g/cm <sup>2</sup> )	-1.04	0.99	NS
	2	Radio distal	BMD (g/cm <sup>2</sup> )	0.74	0.70	NS
	5	Radio proximal	BMD (g/cm <sup>2</sup> )	1.05	1.06	NS
Fentiman et al., 1989	5	Radio distal	BMD (g/cm <sup>2</sup> )	0.74	0.78	NS
	0.5	Fémur	gHA/cm <sup>2</sup>	0.81	0.81	NS
Love et al., 1992	0.5	Espina lumbar	gHA/cm <sup>2</sup>	0.95	0.94	NS
	2	Espina lumbar	Años en % cambio en BMD	-1.0%	0.6%	P<0.0001
Cuzick et al., 1992	2	Radio	Años en % cambio en BMD	1.29%	0.88%	NS
	6	Espina lumbar	BMD (g/cm <sup>2</sup> )	0.97	1.08	NS
	6	Trochanter	BMD (g/cm <sup>2</sup> )	0.75	0.81	NS
Ward et al., 1993	1	Espina lumbar	Años en % cambio en BMD	-2.3%	0.09%	P=0.04
	1	Trochanter	Años en % cambio en BMD	-1.8%	1.4%	P=0.03
Neal et al., 1993	5	Espina lumbar	BMD (g/cm <sup>2</sup> )	1.028	1.059	NS
	5	Femur	BMD (g/cm <sup>2</sup> )	0.838	0.894	NS
Turken et al., 1989	1	Espina lumbar	Años en % cambio en BMD	-2.7%	2.4%	P<0.003
Kristensen et al., 1994	2	Espina lumbar	% cambio en BMD	-4.3% <sup>c</sup>	2.5% <sup>c</sup>	P=0.00074
	2	Radio distal	% cambio en BMD	-6.3% <sup>c</sup>	-2.0% <sup>c</sup>	P=0.024

<sup>A</sup> La suma de nueve estudios examinaron los efectos de la terapia con tamoxifen en la reabsorción de hueso en mujeres (adaptado por Bilimoria et al., 1996a). <sup>B</sup> Abreviaturas: BMC, mineral contenido en hueso; BMD, densidad del mineral en hueso; gHA, gramos de hidroxipalita; NS, no significativo. <sup>C</sup> Porcentajes extrapolados gráficamente.

Cuando el tamoxifeno surgió como una terapia para el cáncer de mama hubo preocupación de que las mujeres tratadas con un antiestrógeno serían afectadas en su perfil de lípidos aumentando el riesgo de enfermedades cardíacas. Varios estudios han mostrado que el tamoxifeno produce efectos semejantes a los de  $E_2$  en los perfiles lipídicos en suero. Los análisis de nueve estudios diferentes han reportado una disminución promedio en el colesterol total del 13% y una disminución promedio en las lipoproteínas de baja densidad (LDL) del 19% (tabla 3; Bilimoria et al., 1996a; Saarto et al., 1996).

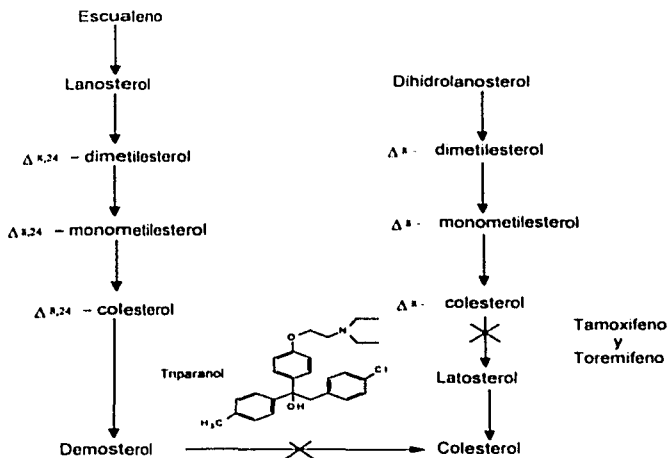


Figura 20. Efectos de toremifeno y tamoxifeno en la síntesis de colesterol. Los compuestos interfieren en la síntesis del colesterol inhibiendo la conversión de  $\Delta^8$ -Colesterol a lanosterol (Gylling et al., 1995). Triparanol, es un fármaco que tiene una estructura relacionada con el MER-25 y actúa bloqueando la conversión de demosterol a colesterol (Avigan et al., 1960; Gaylor, 1963; Frantz et al., 1996; Steinberg et al., 1961).

En un estudio aleatorizado doble ciego de tamoxifeno contra placebo, Love y colaboradores (1991) notaron un incremento en la síntesis de lipoproteínas de baja densidad, un incremento en niveles de triglicéridos e incremento en receptores de apolipoproteína B, lo cual resultó una disminución de niveles de LDL. Un análisis de 5 años apoya el mantenimiento del decremento de LDL y el colesterol total. Otros han notado que el tamoxifeno y el toremifeno (clorotamoxifeno) interfieren con la síntesis de colesterol inhibiendo la conversión de  $\Delta^8$ -colesterol a lanosterol (figura 20; Gylling et al., 1995). Estos cambios metabólicos son consistentes con un

efecto semejante al de los estrógenos sobre el metabolismo de lípidos. De manera interesante, el nivel de las lipoproteínas de alta densidad que usualmente se incrementan por terapia de estrógenos aparentemente no se afecta por la terapia con tamoxifeno.

TABLA 3  
Efectos del tamoxifeno en lípidos en suero

Estudio	Colesterol total (mg/dl)		Colesterol LDL (mg/dl)		Colesterol HDL (mg/dl)		TT	% Cambio	
	Control (no. de pacientes)	TT <sup>b</sup> (no. de pacientes)	% cambio	Control	TT	% cambio			
Rossner and Wallgren, 1984	302(10)	258(11)	-15%	201	156	-22%	87	75	NS
Bruning et al., 1988	220(46)	205(46)	-7%	151	124	-18%	43	50	NS
Bertelli et al., 1988	254(36)	213(55)	-16%	180	127	-29%	55	56	NS
Bagdade et al., 1990	193(8)	204(8)	NS	122	115	-6%	45	49	NS
Love et al., 1991	216(70)	190(70)	-12%	138	110	-20%	57	53	NS
Ingram, 1990	259(47)	234(13)	-9%	193	171	-10%	66	61	NS
Cuzick et al., 1992	256(47)	225(14)	-12%	186	145	-22%	50	43	-14%
Dnistrian et al., 1993	244(13)	203(24)	-17%	169	123	-27%	55	56	NS
Thangaraju et al., 1994)	224(45)	190(39)	-15%	149	132	-17%	54	58	7%
Average	249	214	-13%	165	134	-19%	57	52	NS

<sup>a</sup> La suma de nueve estudios examinaron los efectos de tamoxifeno sobre los perfiles lipídicos séricos. <sup>b</sup> TT, grupos tratados con tamoxifeno; NS estadísticamente no significativo.

La habilidad del tamoxifeno para disminuir lípidos en suero se ha traducido en una significativa reducción en enfermedades cardiacas. En 1991 Mc Donald y Stewart (1991) en una revisión retrospectiva de un ensayo aleatorio de tamoxifeno contra placebo notaron que 10 de 200



mujeres tratadas con tamoxifeno habían muerto de infarto al miocardio mientras 25 de 251 habían muerto de la misma enfermedad en el grupo control. Estudios posteriores de Mc Donald y colaboradores (1995) concluyeron que el riesgo de enfermedad coronaria era significativamente menor para usuarios de tamoxifeno a largo plazo que para usuarios a corto plazo.

También se encontró que tratamientos más largos del tamoxifeno tenían mayores beneficios en proteger de enfermedades cardiovasculares. Rutqvist y Matteson (1993) en un ensayo aleatorio, encontraron que las admisiones a hospital para enfermedades cardíacas eran estadísticamente menores para mujeres que tomaron tamoxifeno por 5 años que las de mujeres que tomaron terapia de 2 años. Un reporte similar notó una elevación en las enfermedades coronarias en una larga población de mujeres posmenopáusicas una vez que el tamoxifeno se había suspendido (Ganz et al., 1995).

La reducción en el riesgo cardiovascular obtenido a partir del uso del tamoxifeno aparentemente está mediado a través de la disminución de niveles de colesterol y la reducción estadísticamente significativa en los niveles de lipoproteínas de suero (Saarto et al., 1996). Se ha sugerido que un 1% del decremento del colesterol del suero resulta en un 2% de decremento en la incidencia de enfermedades cardíacas coronarias. Varios estudios epidemiológicos y clínicos han mostrado que los niveles incrementados de lipoproteínas son un factor de riesgo independiente para la enfermedad cardíaca coronaria. Adicionalmente, el tamoxifeno disminuye los niveles de homocisteína (Anker et al., 1995) y se ha sugerido que el tamoxifeno podría ser cardioprotector reduciendo la oxidación de lipoproteínas de baja densidad.

Debido a que la mayoría de las mujeres con cáncer de mama son posmenopáusicas y la causa número uno de muerte en mujeres posmenopáusicas (sin historia de cáncer de mama) son las enfermedades cardiovasculares, las propiedades de disminución de lípidos del tamoxifeno se vuelven clínicamente importantes en mujeres con factores de riesgo elevados.

#### **6.4 EFECTOS ADVERSOS DE LOS ANTIESTRÓGENOS**

Las acciones en el sitio blanco específico del tamoxifeno se han atribuido también al aumento de cáncer endometrial y el metabolismo del tamoxifeno se ha relacionado con la carcinogénesis de hígado de rata lo que ha llevado a un aumento en los estudios de investigación para elucidar los mecanismos involucrados.

## 6.5 CARCINOGENESIS UTERINA Y HEPÁTICA

Gran controversia ha generado la asociación entre el uso de tamoxifeno y la detección de cáncer endometrial. El carcinoma endometrial humano, Ca101 crece en animales atímicos en respuesta a E<sub>2</sub> y parcialmente en respuesta a tamoxifeno. El tamoxifeno puede inhibir los carcinomas de mama estimulados por estrógeno, pero también puede estimular un carcinoma endometrial transplantado en los mismos ratones atímicos.

Revisiones recientes de literatura (Jordan y Assikis, 1995; Assikis et al.,1995) han identificado aproximadamente 400 casos de cáncer endometrial asociado con el uso de tamoxifeno en el mundo en diez años. La enfermedad se encuentra predominantemente en mujeres postmenopáusicas, no se ha encontrado asociación entre la duración de uso de tamoxifeno y los riesgos de desarrollar carcinoma endometrial. El estudio de Stockholmo, que originalmente concluyó que después de 2 años de tamoxifeno como adyuvante no causa un incremento en el cáncer endometrial pero después de 5 años causó un incremento de seis veces en el riesgo de cáncer endometrial, actualmente se esta evaluando este estudio (Jordan y Morrow, 1994) ya que hay poca evidencia publicada para una asociación entre el uso prolongado de tamoxifeno y un incremento de cáncer endometrial.

Las pacientes tratadas con tamoxifen están en bajo riesgo, 2 de 1000 mujeres por año, de cáncer endometrial durante o después del tratamiento de tamoxifeno. El consenso colectivo es que los beneficios del tamoxifeno en el tratamiento del cáncer de mama sobrepesan los riesgos asociados con la elevación de carcinoma endometrial. Como precaución, los pacientes deben ser examinados antes de empezar un curso de terapia de tamoxifeno adyuvante en carcinoma endometrial preexistente y durante el tratamiento deben pasar a examinación ginecológica periódica. Una evaluación reciente de la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer concluyó que ningún paciente debe ser excluido de tratamiento con tamoxifeno por preocuparse por cáncer endometrial, los beneficios sobrepasan el riesgo.

Varios investigadores reportaron que el tamoxifeno es un iniciador y un promotor de carcinogenesis en el hígado de ratas. El tamoxifeno en dosis altas, produce aductos de DNA en el hígado de rata, sin embargo, solamente la formación de un aducto bajo se ha reportado en DNA de hígado de ratón. Es necesario hacer notar que no se ha demostrado incremento en la formación de aductos de DNA en los hígados de pacientes que están recibiendo tamoxifeno. Como resultado se ha argumentado que los estudios en rata no son extrapolables al uso en humanos.

Los datos de estudios de carcinogenesis en rata demuestran que los animales reciben tamoxifeno (5 a 50 mg/kg diariamente) por más del 50% de su vida (Jordan y Morrow, 1994). En contraste, la dosis terapéutica de tamoxifeno como un agente anticáncer en ratas es de 250 µg/kg la cual es equivalente a la dosis terapéutica de un paciente de 70 kg de 285 µg/kg que serían de 20 mg de tamoxifeno diarios. La duración de la terapia adyuvante para pacientes postmenopáusicas es aproximadamente de 5 años. Esto sería el equivalente de un 8% de la vida de una mujer. Así los experimentos animales de dosis de 5 mg/kg es el equivalente a una niña adolescente (14 años de edad) recibiendo 20 veces la dosis diaria de tamoxifeno (40 tabletas al día) hasta que tiene 40 años de edad.

La razón para administrar dosis altas en la rata es debido a que estas logran la producción de niveles comparables del fármaco con los humanos, generalmente el fármaco es eliminado por la rata diez veces más rápido que en el humano (Jordan y Morrow, 1994).

### **MECANISMOS DE CARCINOGENESIS**

La carcinogenesis hepática de rata inducida por el tamoxifeno y su relevancia en humanos ha sido estudiada en los últimos años. Han y Liehr (1992) primero notaron una acumulación de aductos de DNA en el hígado de ratas Sprague-Dawley por inyecciones repetidas de 20mg/kg (dosis humana de 0.3 mg/kg) de tamoxifeno. La identificación del aducto de DNA ha propuesto varios candidatos: un epóxido (Styles et al., 1994; Lim et al., 1994; Philips et al., 1994b), 4-OHT (Moorthy et al., 1996), Metabolito E (Pongracz et al., 1995) o  $\alpha$ -hidroxitamoxifen (Potter et al., 1994; Philips et al., 1994a,c). Recientemente Osborne preparó un acetoxitamoxifen que es capaz de reaccionar con DNA considerablemente (1 a 50 bases) el  $\alpha$ -hidroxitamoxifeno (1 en 105 bases de DNA). Los productos de estas reacciones fueron idénticos a aquellos aislados de DNA de hepatocitos de rata o hígados de ratas tratados con tamoxifeno. El aducto de tamoxifeno y DNA ha sido identificado en el nucleósido desoxiguanosina en la posición  $\alpha$  del tamoxifeno que está unida covalentemente al amino exocíclico de desoxiguanosina (figura 21).

La activación metabólica del tamoxifeno y su metabolito  $\alpha$ -hidroxitamoxifeno ha sido estudiada y comparada utilizando cultivos primarios de rata, ratón y hepatocitos humanos. A pesar de que los aductos de DNA son identificados fácilmente en hepatocitos de rata y ratón (90 y 15 aductos/108 nucleótidos, respectivamente), no fueron detectados en hepatocitos humanos tratados con tamoxifeno.

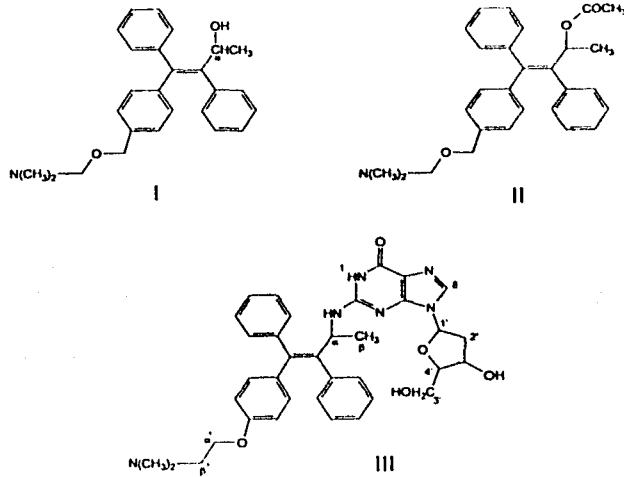


Figura 21. El aducto de tamoxifeno y DNA III. La posición  $\alpha$  del tamoxifeno se une covalentemente al amino exocíclico de desoxiguanosina.

Adicionalmente, los hepatocitos humanos también produjeron 50 veces menos niveles de  $\alpha$ -hidroxitamoxifeno a partir de tamoxifeno que los hepatocitos de rata. Estudios posteriores mostraron que las células de hepatocitos humanos tratadas con  $\alpha$ -hidroxitamoxifeno tenían 300 veces menos de niveles de aductos que los hepatocitos de ratas.

Los estudios en pacientes han confirmado que los humanos tiene menor susceptibilidad que las ratas a formar aductos de DNA con tamoxifeno (Martin et al., 1995). Estudios posteriores han señalado que los aductos de DNA podrían ser producidos en muestras endometriales con  $\alpha$ -hidroxitamoxifeno pero no con tamoxifeno.

## 6.6 MECANISMOS DE RESISTENCIA AL FÁRMACO

La resistencia a la terapia con tamoxifeno puede ser de diferentes formas (Tonetti y Jordan, 1995). Estas están ilustradas en la figura 22. El tamoxifeno y sus metabolitos son inhibidores competitivos de  $E_2$  uniéndose a RE, así un gran incremento en  $E_2$  posiblemente podría revertir la acción antitumoral del fármaco. Esto ha sido una preocupación en las mujeres premenopáusicas en cuanto al incremento de tamoxifeno y el incremento de secreción por el

ovario; sin embargo, los estudios de laboratorio muestran que solamente muy altos niveles de estrógeno y bajos niveles de tamoxifeno pueden provocar la falla del tamoxifeno. Consideramos cada uno de los posibles mecanismos de resistencia al fármaco que están siendo evaluados.

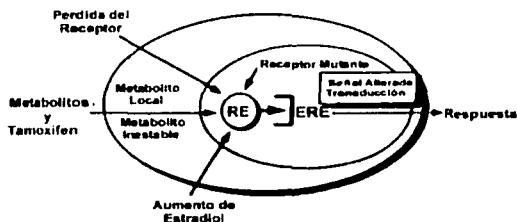


Figura 22. Posibles mecanismos involucrados en la adquisición de resistencia a tamoxifeno.

### RECEPTORES MUTANTES

El mecanismo de acción de los antiestrógenos es principalmente por competencia con  $E_2$  por el sitio de unión de la hormona en el RE. El resultado es la formación de un complejo que es capaz de interactuar con los EREs, incapaces de activar la transcripción. Así, la inactivación funcional del RE por una mutación que incrementa la eficiencia del complejo antiestrogénico RE es un mecanismo similar al mecanismo adquirido de la resistencia a tamoxifeno. La mutagénesis dirigida para crear cambios de amino ácidos específicos en el DUH ha demostrado que afecta la afinidad de unión de ligando al receptor, la unión al DNA así como la transactivación transcripcional (Mahfoudi et al., 1995). Las mutaciones específicas en el DNA y LUD del RE pueden causar que un antiestrogénico transmita una señal agonista en vez de antagonista. Jiang y sus colaboradores (1992a, 1993) demostraron que una mutación de una valina por una glicina del codón 400 en el LUD del RE puede causar incremento en la actividad estrogénica en respuesta a 4-OHT y a otros antiestrógenos.

Los antiestrógenos inicialmente controlan el crecimiento tumoral pero eventualmente pueden desarrollar tumores (Wolf y Jordan, 1994a). Se han caracterizado tumores estimulados por tamoxifeno, que contienen mutaciones dentro del RE. El reemplazamiento de un aspartato por una tirosina en el aminoácido posición 351 (Wolf y Jordan, 1994b) dio lugar a una respuesta farmacológica alterada de un antiestrogénico a estrógeno (Catherino et al., 1995; Levenson et al., 1997). Mahfoudi y colaboradores (1995) sugirieron que las mutaciones específicas en la región FA-2 del receptor de estrógenos eran responsables de la respuesta sobre el RE del tamoxifeno.

## VÍAS ALTERNAS

La fosforilación de receptores de hormonas esteroides pueden mediar la unión de la hormona y DNA así como la activación transcripcional. Evidencia reciente sugiere que la fosforilación específica de al menos cuatro residuos de serina localizados en la región N terminal A/B del RE es inducida por  $E_2$ , 4-OHT, el antiestrogeno puro ICI 164,384, así como activadores de la proteína cinasa A y C (Le Goff et al., 1994). Varias proteínas cinasas incluyendo PKC, PKA, caseína cinasa y la familia de cinasas src han sido implicadas en la mediación de la fosforilación.

La resistencia al tamoxifeno, sin embargo, puede elevarse por la alteración del patrón de fosforilación requerido para la activación transcripcional apropiada. La alteración puede residir dentro de la proteína cinasa misma, resultando una fosforilación aberrante del RE. El tamoxifeno es un inhibidor específico de al menos una proteína cinasa, la PKC. Si la actividad inhibitoria ocurre *in vivo*, el tamoxifeno también reducirá la fosforilación del RE y atenuará la activación transcripcional al competir con el  $E_2$  por la unión al RE. Si la PKC adquiere una mutación que previene la actividad inhibitoria del tamoxifeno, la activación de los genes de respuesta a estrógeno puede ocurrir.

La activación de la vía de PKA ha demostrado que incrementa la actividad agonista del complejo tamoxifeno-RE usando promotores reporteros conteniendo dos EREs (Fujimoto y Katzenellenbogen, 1994). La actividad transcripcional del complejo antiestrogeno-RE incrementa de 20 a 75% la de  $E_2$  elevando los niveles intracelulares de AMPc o la expresión de vectores conteniendo subunidades catalíticas PKA. Esto sugiere que el cruce de mensajes entre el AMPc y las vías de transducción dependiente del RE podrían existir. De este modo, los niveles aumentados de AMPc pueden llevar al desarrollo de crecimiento de tumores estimulados por tamoxifeno.

Otra vía alternativa interesante recientemente ha sido implicada en la habilidad de antiestrogénos para actuar como agonistas en ciertos genes conteniendo sitios AP-1 (Webb et al., 1995). Esto es un evento mediado por RE que parece ser célula específica, por ejemplo la activación de AP-1 estimulada por tamoxifeno puede ser observada en líneas celulares de origen uterino pero no de mama.

Muchos estudios de líneas celulares estimuladas o dependientes de antiestrogénos han sido desarrollados para determinar el mecanismo de progresión de resistencia a antiestrogénos o la estimulación de antiestrogénos en crecimiento tumoral. Estos estudios analizan la importancia de vías alternativas de las impredecibles respuestas celulares al tratamiento con antiestrogénos a largo plazo y para conocer la complejidad de estas respuestas.

## 6.7 METABOLISMO DE ANTIESTRÓGENOS

Se han identificado dos rutas principales de metabolismo del tamoxifeno: la 4-hidroxilación y la degradación del dimetilaminoetano de la cadena lateral.

El tamoxifeno es hidroxilado en la posición 4 para producir 4-OHT, un metabolito menor en ratas y en humanos pero que tiene una alta afinidad de unión por el RE (Jordan et al., 1977) este es un metabolito principal en el ratón. Los antiestrógenos que tienen un grupo metoxilo en una posición equivalente al 4-OH tamoxifeno, por ejemplo U 23,469 (un análogo del antiestrógeno nafoxidina) o nitromifin, pueden ser desmetilados al metabolito hidroxilado que posee alta afinidad de enlace por el receptor de estrógenos.

La desmetilación de la cadena lateral del tamoxifeno primero a N-desmetiltamoxifeno, es el principal metabolito en humanos. Sin embargo, la posterior desaminación primero al derivado glicol y la desalquilación produce un cambio de un antiestrógeno a un estrógeno. Esto ha sido propuesto como una explicación de la resistencia del tamoxifeno y el crecimiento estimulado por tamoxifeno (Jordan et al., 1983).

Numerosos grupos han identificado rutas metabólicas mediadas por los citocromos P-450 para el tamoxifeno en la rata (Lim et al., 1994; Phillips et al., 1996a). La N-desmetilación de tamoxifeno es catalizada por las enzimas CYP1A, CYP2C y CYP3A y en el humano por CYP3A (Mani et al., 1993a). El metabolismo a N-óxido de tamoxifeno, un precursor de la N-desmetilación está mediado por una monooxigenasa que contiene flavina, mientras la 4-hidroxilación parece estar catalizada por citocromo P450 constitutivo.

En monos rhesus macho y hembra, Comoglio y colegas (1996) encontraron que había una acumulación significativa N,N-desmetiltamoxifeno, el cual es un inhibidor del metabolismo del fármaco. El nivel de formación de aductos de DNA fue sustancialmente más bajo en monos que en ratas.

La inducibilidad de P450 por tamoxifeno, toremifeno y droloxifeno ha sido evaluado en la rata y el ratón. El tamoxifeno es un carcinógeno en el hígado de rata (Furr y Jordan, 1984) pero no del ratón (Hard et al., 1993; Hassman et al., 1994). Todos los antiestrógenos inducen CYP2B1 y CYP3A1 en el hígado de rata podrían ser responsables de la promoción de carcinogénesis. Adicionalmente, los sistemas de enzimas de fase II son afectados por tamoxifeno.

## ACTIVACIÓN METABÓLICA

El tamoxifeno se convierte a 4-OHT y N-desmetiltamoxifeno. A pesar de que 4-OHT es un metabolito menor es un potente antiestrogeno que se une al RE humano con una afinidad similar al  $E_2$ , mientras N-desmetiltamoxifeno, el metabolito principal del tamoxifeno es un antiestrógeno débil.

Este mecanismo de resistencia del tamoxifeno ha sido explorado mediante la cuantificación y comparación de los niveles de tamoxifeno y sus metabolitos en la generación de tumores estimulados e inhibidos por tamoxifeno. Osborne y colaboradores (1991) reportaron que los tumores estimulados por tamoxifeno tienen niveles reducidos de tamoxifeno comparados con los tumores que son inhibidos con tamoxifeno. También se ha encontrado un incremento de la relación cis/trans 4-OHT y acumulación de Metabolito E (figura 23; Osborne et al., 1991). Johnston y colaboradores (1993a) demostraron que los tumores RE negativos acumulan tamoxifeno y sus metabolitos más lentamente que los RE positivos.

Para conocer la reacción de isomerización es necesaria para el desarrollo de la resistencia de tamoxifeno adquirida, análogos del tamoxifeno con anillos no isomerizables fueron ensayados para determinar si el crecimiento tumoral ocurría (Osborne et al., 1994). Un derivado de tamoxifeno inhabilitado para formar el potente isómero estrogénico Metabolito E podía estimular el crecimiento de células MCF-7 igual que tamoxifeno (Wolf et al., 1993). De manera similar, un análogo de oxitamoxifeno utilizado para eliminar la posibilidad de anclaje de cadena lateral que previene la producción de metabolito E o bisfenol se encontró que era similar al tamoxifeno estimulando el crecimiento tumoral. Estas evidencias sugieren que la isomerización de tamoxifeno a metabolitos estrogénicos o antiestrogénicos menos potentes no explican el crecimiento de tumores estimulados por tamoxifeno, siendo necesario encontrar los mecanismos alternativos.



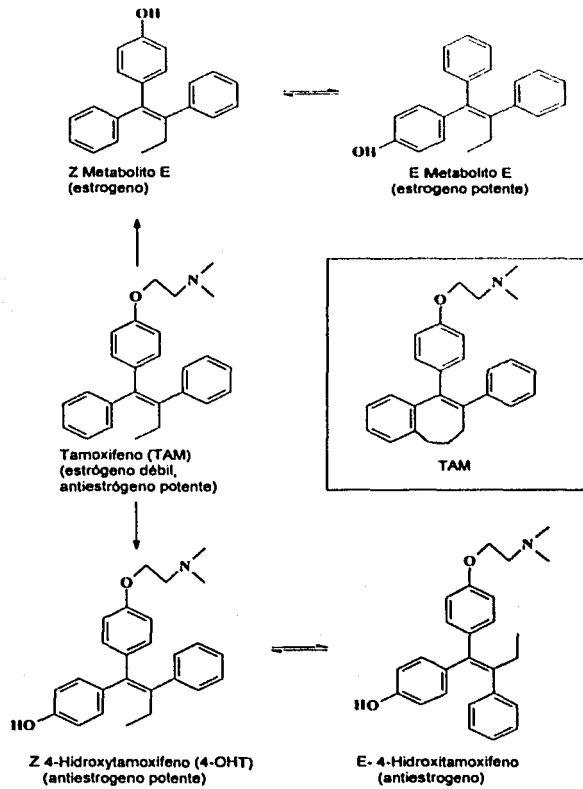


Figura 23. El metabolismo del tamoxifeno puede ser por dos rutas. La primera conversión es Z-4-hidroxitamoxifeno (Z-4-OHT) un antiestrógeno potente. El otro metabolito potente es el Z metabolito E (Z Met E), es un potente estrógeno.

## 7. NUEVOS COMPUESTOS Y NUEVAS OPORTUNIDADES

La aplicación clínica que se sugirió del primer antiestrogeno MER-25 descubierto por Lerner y colaboradores (1958), era como un anticonceptivo debido a que era un agente antifertilidad en la rata. Los trifeniletilenos clomifeno y tamoxifeno (Harper y Walpole, 1967a,b) producían efectos anovulatorios en ratas, pero además inducían ovulación en mujeres subfértiles. Esto disminuyó el interés en esta área de investigación, sin embargo reportes recientes de la India sugieren que los estudios con antiestrógenos como anticonceptivos continúan. El fármaco centchroman (figura 24) ha sido estudiado extensamente en el laboratorio y los estudios preliminares en humanos han finalizado.

Adicionalmente, el grupo de desarrollo de fármacos en Lucknow, India ha descrito una serie extensa de compuestos. El compuesto antiestrogénico más potente del grupo está ilustrado en la figura 24. La potencia se deriva de los dos hidroxilos estratégicamente colocados, pero el cambio de posición del fenil alquilaminoetoxi de la cadena lateral recuerda la localización de la cadena lateral en ICI 182,780 (figura 10). El grupo Labrie en Canadá recientemente describió un antiestrogeno puro EM-800 (figura 25) activo por vía oral con marcada similaridad a los compuestos Lucknow.

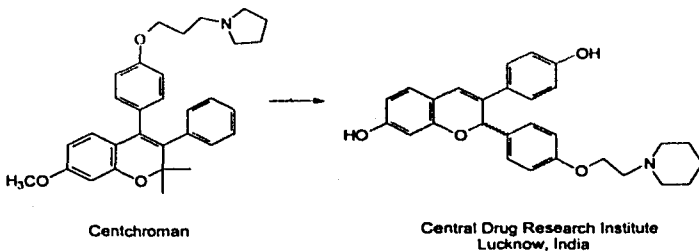


Figura 24.

## 7.1 MODULADORES SELECTIVOS DEL RECEPTOR DE ESTROGÉNO (Selective estrogen receptor modulators; SERMs)

Actualmente, se está realizando la evaluación de la terapia adyuvante con tamoxifeno en la Gran Bretaña para definir la duración óptima del tamoxifeno para cáncer de mama nodo positivo. De manera general, el tamoxifeno es el fármaco de elección en la terapia del cáncer de mama.

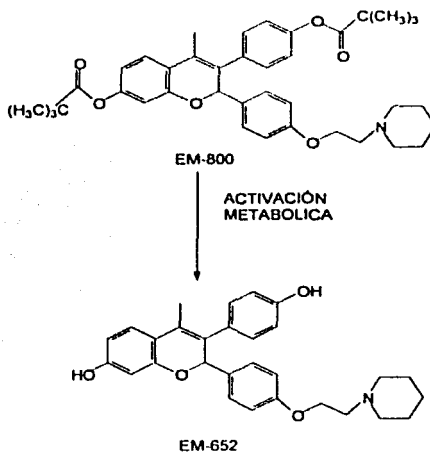


Figura 25. La activación metabólica por vía oral del antiestrogeno puro EM-800, da lugar a el metabolito EM 652 (Simard et al., 1997).

La segunda estrategia que es controversial es el uso clínico de tamoxifeno como un agente preventivo del cáncer de mama en mujeres de alto riesgo. El concepto originalmente estaba basado en tres hechos conocidos: la seguridad clínica del tamoxifeno, la habilidad del tamoxifeno para prevenir cáncer mamario en ratas (Jordan, 1974,1976), y la habilidad del tamoxifeno para prevenir cáncer de mama contralateral. Las pruebas clínicas piloto originalmente fueron iniciadas en 1986 con 2000 mujeres asignadas aleatoriamente a recibir tamoxifeno o placebo por 8 años. El estudio original completo espera reclutar 20,000 mujeres de alto riesgo en el Reino Unido y Australia.

En Norte América, se ha completado el reclutamiento de 13,000 mujeres de muy alto riesgo aleatoriamente asignadas a recibir tamoxifeno o placebo por 5 años. Los análisis recientes muestran un 45% de disminución en la incidencia de cáncer de mama con tamoxifeno. En Italia,

está contemplado un seguimiento de 20,000 mujeres de riesgo normal, las cuales han tenido una histerectomía y han sido asignadas aleatoriamente a recibir tamoxifeno o placebo por 5 años.

La estrategia antiestrogénica para el cáncer de mama está ilustrada en la figura 26. Tras la falla del tamoxifeno (Buzdar et al., 1996). Un gran numero de inhibidores de aromatasa se están evaluando actualmente para enfermedades avanzadas.

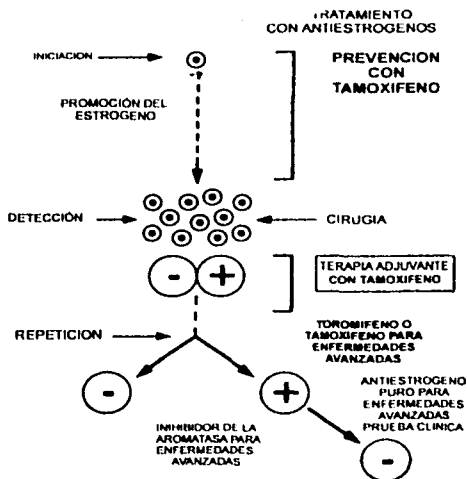


Figura 26. Estrategia clínica actual en el tratamiento de cáncer de mama.

Su uso se fundamenta en el hecho de que la enfermedad resistente al tamoxifeno requiere de estrógeno para crecer, así mediante la reducción del E<sub>2</sub> y estrona circulantes, la enfermedad perderá su estímulo de crecimiento. Desde 1987 una nueva aproximación para la prevención del cáncer de mama fue propuesta, debido a que el tamoxifeno y el raloxifeno pueden mantener la densidad de los huesos en ratas, esta propiedad podría ser usada para prevenir la osteoporosis en pacientes posmenopáusicas. La meta era introducir una nueva terapia de reemplazamiento de hormonas para prevenir la osteoporosis pero disminuir la incidencia de cáncer endometrial y cáncer de mama en la población general como un efecto secundario benéfico (Lerner y Jordan, 1990).

## **ANÁLOGOS DE TAMOXIFENO PARA CÁNCER DE MAMA**

El toremifeno o clorotamoxifeno (figura 9) está disponible en los Estados Unidos para el tratamiento de la fase IV de cáncer de mama en pacientes posmenopáusicas.

El fármaco es antiestrogénico (Kangas et al., 1986) y tiene actividad antitumoral en cáncer mamario inducido por carcinógenos en rata (Roninson et al., 1988; DiSalle et al., 1990), aproximadamente un tercio de la potencia del tamoxifeno. Estas observaciones de laboratorio traducidas a la clínica dan que 60 mg diariamente de toremifeno se recomiendan para el tratamiento de la Etapa IV de cáncer de mama comparado con la dosis estándar de 20 mg diariamente de tamoxifeno.

El toremifeno ha sido probado en las pruebas de la fase clínica I y III (Hayes et al., 1995). Los efectos secundarios son similares a los del tamoxifeno, y debido a que la mayoría de los pacientes actualmente han tomado terapia adyuvante con tamoxifeno, la resistencia cruzada es extremadamente importante. Los aspectos interesantes de la farmacología del toremifeno son su reducida carcinogenicidad en el hígado de la rata y no hay reportes acerca de una asociación entre el toremifeno y el cáncer endometrial.

## **RALOXIFENO (CRISTALIZACIÓN DEL COMPLEJO- RECEPTOR RALOXIFENO ESTRÓGENO)**

La estructura de cristal del DUL del RE con estradiol o raloxifeno fue publicada (Brozowski et al., 1997). Este conocimiento ahora provee una importante visión en la acción de los estrógenos. Los hidroxilos del estradiol específicamente se unen a los amino ácidos 353 y 394 en el DUL (figura 27) y esto causa que la larga hélice 12 se doble y atrape al esteroide. La hélice 12 contiene tres aminoácidos específicos, 540, 543 y 547 los cuales son críticos, dentro de la región AF-2 para la unión de coactivadores (Tzuckerman et al., 1994).

Los grupos fenólicos del raloxifeno se unen a los mismos aminoácidos que el estradiol (figura 27; Brzowski et al., 1997), pero la diferencia crítica es la interacción de la cadena lateral alquilaminoetoxi con el aminoácido aspartato, en la posición 351. La cadena lateral aminoetoxi de los antiestrógenos es esencial para bloquear la acción del estrógeno (Jordan, 1984). Las distancias entre el nitrógeno y el oxígeno, los cambios en la basicidad del nitrógeno y la orientación de la cadena lateral, todos tienen influencias en las propiedades del antiestrogeno (Jordan y Gosden, 1982).

La estructura del cristal del complejo raloxifeno-RE demuestra que la Hélice 12 se reorienta y no puede cerrar el complejo conteniendo el ligando (figura 27).

Las perturbaciones macromoleculares en la estructura cristalográfica son la consecuencia de unión del antiestrogeno y no la causa de la acción del antiestrogeno. Los modelos iniciales describían un bloqueo del ligando de antiestrógenos en las mandíbulas de DUL para evitar la activación y encierro del ligando para formar un "complejo estrogénico" (Tate et al., 1984). Los modelos propuestos a partir de ensayos farmacológicos atribuyen a la cadena lateral alquilaminoetoxi y su unión en la región antiestrogénica del receptor la propiedad de prevenir el cierre de las mandíbulas de la región DUL (Lieberman et al., 1983a). Esa "región" es identificada como el aminoácido 351 (Brzozowski et al., 1997).

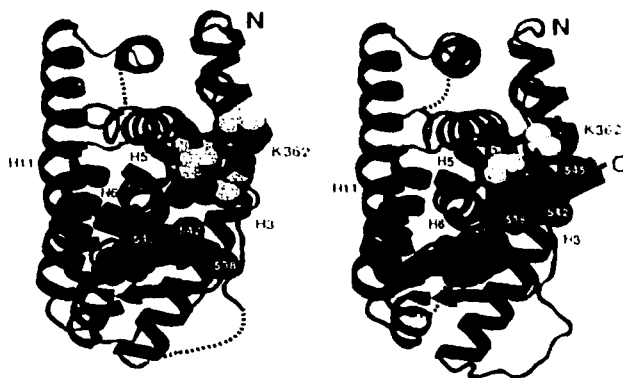


Figura 27. La proteína receptora en tercera dimensión plegada alrededor del E<sub>2</sub> complejo ligando-receptor activado. La hélice 12 se muestra al otro lado del esteroide y envuelve a la unión-ligando. El aminoácido crítico 538, 542, y 545 en la región de la FA-2 permite la unión de coactivadores antes de la transcripción del complejo. En contraste, el raloxifeno ocupa el sitio de unión, los aminoácidos en la región FA-2 de la hélice 12 responden sin activarse la transcripción. Reproducido por Brzozowski et al. (1997) con permiso de Nature.

La validez de este modelo se basa en estudios con el receptor mutante en el cual el aminoácido 351 es cambiado de un aspartato a una tirosina (Wolf y Jordan, 1994b). Para probar la acción farmacológica del receptor mutante, el tipo salvaje y el receptor mutante 351 han sido transfectados en células de cáncer de mama MDA-MB-231 (Jiang y Jordan, 1992; Catherino et al., 1995). El  $E_2$  incrementa TGF $\alpha$  mRNA de una manera dependiente de la concentración en ambos el tipo salvaje y REs mutados (Levenson et al., 1997, Levenson y Jordan, 1998). El raloxifeno es un antiestrogeno en el receptor tipo salvaje pero se vuelve estrogénico en el receptor mutante 351. Estos resultados están ilustrados en la figura 30. El antiestrogeno puro ICI 182,780 es un antiestrogeno en ambos transfectantes; por lo tanto la conformación del complejo receptor debe ser diferente del complejo raloxifeno-RE.

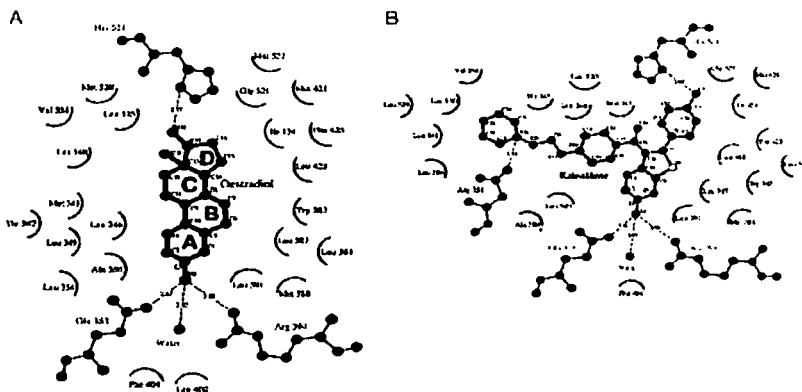


Figura 28. La interacción de (a) estradiol y (b) raloxifeno con un aminoácido crítico en el DUL del RE. (Brzozowski et al., 1997)

El descubrimiento de un receptor mutante 351 confirma la importancia farmacológica de este aminoácido para la antiestrogenicidad del raloxifeno. También ilustra el mecanismo de resistencia al fármaco tamoxifeno, ya que el receptor mutante fue aislado a partir de tumores de mama estimulados por tamoxifeno e incrementó la estrogenicidad de análogos de tamoxifeno (Catherino et al., 1995). Este es el primer ejemplo confirmado de un mecanismo de resistencia para un antiestrogeno.

Extensos estudios de relación estructura actividad han sido reportados (Jones et al., 1984; Grese et al., 1997) con benzotiofenos; sin embargo, dos compuestos, LY 117,018 y LY 156,758 (figura 29) poseen una alta afinidad de unión por el RE, por tener una actividad potente antiestrogénica, pero tienen poca actividad uterotrófica en roedores (figura 19). Extensos estudios en ratas han confirmado los reportes originales de que el raloxifeno preserva la densidad del hueso en respuesta a la ooforectomía. Fournier y colaboradores (1996) han concluido que el raloxifeno estimula la expresión de TGF  $\beta$ 3 en huesos de rata (Yang et al., 1996a), resultados que constituyen el fundamento para la evaluación del raloxifeno en la prevención de osteoporosis.

El raloxifeno causa una disminución en el colesterol circulante en la rata y en humanos. Además muestra el perfil de un modulador de RE selectivo (SERM) que podría ser aplicado como un agente preventivo para la osteoporosis pero con el beneficio adicional de prevenir el cáncer de mama y la enfermedad cardíaca de coronarias. La evaluación del raloxifeno para la prevención de osteoporosis está en pruebas clínicas alrededor del mundo. Once mil mujeres han sido asignadas aleatoriamente a recibir ya sea raloxifeno o placebo. Los datos preliminares demuestran que el raloxifeno mantiene la densidad (Gunness et al., 1997) del hueso pero tiene un perfil no estrogénico en el útero humano (Scheele et al., 1997) y en mama (Jordan et al., 1998).

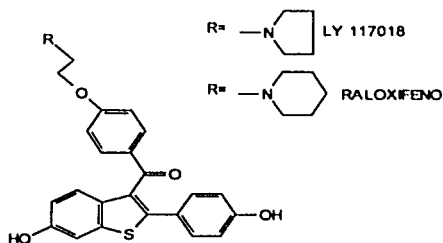


Figura 29.

### DROLOXIFENO:

La farmacología general y la toxicología del droloxifeno se han evaluado. El droloxifeno o 3-hidroxitamoxifeno es un antiestrogeno con actividad antitumoral bien documentada en modelos de laboratorio y se está evaluando en cáncer de mama de etapa IV. Es un agente que tiene una eliminación rápida y puede ser conjugado rápidamente por enzimas del metabolismo de fase II.



Las dosis de 60 mg diarios y mayores son efectivas en el tratamiento de cáncer de mama (Lien et al., 1995). El droloxifeno no produce aductos de DNA o tumores hepáticos en ratas. Estas propiedades lo están postulando como un agente preservador de huesos (Ke et al., 1995a,b).

### **IDOXIFENO:**

Este derivado de trifeniletileno (figura 9) fue diseñado para desarrollar un fármaco con eficacia en la prevención de osteoporosis y el tratamiento del cáncer de mama por ser metabólicamente estable y de menor potencial carcinogénico. El grupo 4-yodo previene la 4-hidroxilación, y el grupo pirrolidino previene el metabolismo de la cadena lateral. Sin embargo, reportes publicados recientemente enfocan su potencial como un agente antiestrógeno-anticáncer. El idoxifeno inhibe el crecimiento de tumores mamarios en rata inducidos por carcinógenos, el crecimiento de células de cáncer de mama MCF-7 *in vitro*, y tumores inoculados en ratones atímicos (Johnston et al., 1997). El idoxifeno parece desarrollar resistencia adquirida más lentamente que el tamoxifeno, así su potencial se está considerando para tratamientos más largos como un adyuvante o como terapia de segunda elección cuando el tamoxifeno falla. Adicionalmente el idoxifeno ha sido evaluado como un inhibidor de la calmodulina y la p-glicoproteína para resistencia multifármacos. Extensos estudios de relaciones estructura actividad de trifeniletilenos e inhibición de calmodulina han demostrado que el idoxifeno es cinco veces más activo que el tamoxifeno como un inhibidor. Un análogo con una cadena lateral [(CH<sub>2</sub>)] más larga fue 30 veces más potente .

Los estudios clínicos con idoxifeno como agente anticáncer de mama se están llevando a cabo mundialmente. En el presente solamente un solo reporte de el estudio de fase I ha aparecido. Como podría esperarse de un fármaco metabólicamente estable, el idoxifeno tiene una vida media terminal de 23.3 días. El idoxifeno está en una etapa temprana de desarrollo clínico para la osteoporosis en mujeres postmenopáusicas y como un tratamiento preventivo de cáncer de mama.

### **EM-800**

El compuesto EM-800 es un antiestrogeno activo por vía oral (Gauthier et al., 1997). El compuesto EM-800 y su versión esterificada EM-652 (Simard et al., 1997b), la cual indudablemente es el compuesto activo, tienen estereoquímica que es reminiscente del compuesto ICI 182,780 con una cadena lateral hidrofóbica en la posición 7  $\alpha$  de E<sub>2</sub> (figura 9 y 25).

Los estudios preliminares demuestran que EM-800 es un agente antitumoral en el modelo DMBA (Luo et al., 1997c,d) y estudios a largo plazo en el ratón muestran una clara actividad antiestrogénica con poca o ninguna actividad estrogénica comparado con el tamoxifeno o toremifeno (Simard et al., 1997b). El fármaco es extremadamente potente contra células de cáncer de mama en cultivo (Simard et al., 1997a) y previene el crecimiento de tumores estimulados por estrógeno en ratones atímicos.

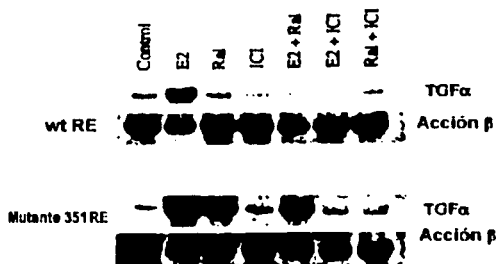


Figura 30. La detección de TGF $\alpha$  mRNA en el análisis de mancha blanca para MDA-MB-231 en células de cáncer de mama transfectadas con DNAc con tipo salvaje en el mutante 351 de RE. Las células tratadas con estradiol ( $10^{-6}$  M), raloxifeno, o ICI 182, 780 ( $10^{-6}$  M). Adaptado por Levenson et al., 1997.

Un antiestrogeno puro activo por vía oral sería extremadamente valioso como una terapia de segunda elección después de que el tratamiento de tamoxifeno ha fallado. Sin embargo, aún falta evaluar su potencial de resistencia cruzada con tamoxifeno y la reducción de la densidad ósea en ratas.

### TRIMETIL TAMOXIFENO Y GW 5638

El trimetil tamoxifeno es un derivado cuaternizado del tamoxifeno (Biegon et al., 1996) que tiene baja retención en el SNC, pero produce la acción apropiada del tamoxifeno en la periferia. Los estudios usando ratones atímicos implantados con tumores de mama MCF-7 muestran que el derivado de amonio cuaternario tiene actividad antitumoral.

La principal preocupación con los compuestos de amonio cuaternario es la ruta de administración. Todos los estudios *in vivo* se usaron inyecciones y se cree que los compuestos

cuaternarios de amonio tienen baja actividad oral, sin embargo, el hecho de que los derivados de tamoxifeno son extremadamente lipofílicos sugiere que la absorción, podría ser posible. Los estudios deben comparar y contrastar rutas de administración para confirmar estas hipótesis.

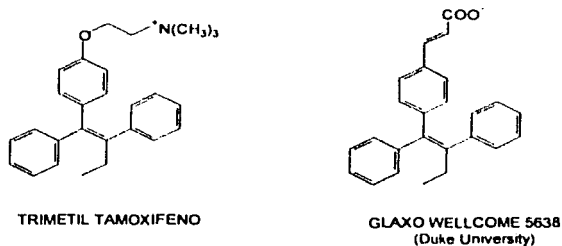


Figura 31. La periferia selectiva de antiestrógenos se usa en terapias binarias con estrógenos

El compuesto GW5638 (figura 31) es particularmente interesante debido a que parece encuadrar en el criterio requerido de agente selectivo periféricamente. La meta principal del descubrimiento de fármacos dirigidos es lograr acción antiestrogénica completa o pura en mama y el útero pero mantener actividad completamente estrogénica en los huesos y bajos niveles circulantes de colesterol. El GW 5638 es un ácido carboxílico, y como resultado, puede haber baja penetración en el SNC. GW 5638 tiene actividad agonista completa para mantener la densidad de huesos y disminuir el colesterol en ratas ovariectomizadas pero baja actividad agonista en el útero. El fármaco posee acciones antitumorales en cáncer de mama transplantados en ratones atímicos. El compuesto es un antiestrogeno completo en el ensayo de mutante RE FA-2 desarrollado en células HepG2 utilizando el sistema promotor C3. Estas observaciones crean una nueva clase de antiestrógenos, que pueden ser importantes en el diseño de futuros fármacos dirigidos a no tener actividad uterina.

Los compuestos ilustrados de la figura 17 son derivados de tamoxifeno y ambos tienen potencial para pruebas clínicas. Sin embargo, cualquier fármaco introducido en la medicina general hoy debe estar libre de potencial carcinogénico en pruebas de laboratorio. El hecho de que estos agentes son derivados de tamoxifeno sugiere que hay una alta probabilidad para producir carcinogénesis en el hígado de rata. Es necesario desarrollar un método alternativo para determinar el potencial carcinogénico de los nuevos fármacos de manera más rápida.

## ANTIESTRÓGENOS PUROS PARA EL CÁNCER DE MAMA

Hay solamente un compuesto que ha pasado a pruebas clínicas el ICI 182,780 (figura 10). Aún no hay reportes clínicos de RE 58,668 o EM-800. El ICI 182,780 tiene una pobre biodisponibilidad oral pero es un antiestrogeno efectivo por inyección de depósito (Wakeling, 1994). No tienen virtualmente efectos de tipo estrogénico y puede ser efectivo inhibiendo el crecimiento de cáncer de mama (Osborne et al., 1995). Inhibe el crecimiento de tumores endometriales y numerosos estudios en el mono no muestran efectos agonistas en el útero.

El ICI 182,780 se recomienda como terapia endocrina de segunda elección cuando falla el tamoxifeno (Howell et al., 1995, 1996). Los efectos secundarios parecen ser mínimos y estudios más amplios se están llevando a cabo en los Estados Unidos. Este grupo de agentes serán valiosos para el tratamiento del cáncer de mama en etapa IV y en la terapia adyuvante para pacientes de alto riesgo de estadio II con nodos linfáticos positivos superiores a 10. Sin embargo, los estudios sobre cambios en la densidad ósea necesitan ser considerados en etapas tempranas de la enfermedad.

---

---

## 8. CONCLUSIONES

Cuarenta años atrás, Lerner y colaboradores descubrieron el primer antiestrogeno no esterooidal y Jensen identificó un blanco para la acción de  $E_2$ . Este conocimiento abrió numerosas posibilidades para el desarrollo clínico de nuevos fármacos. El tamoxifeno a dado una mayor supervivencia a pacientes con cáncer de mama con RE positivos. El fármaco ha sido estudiado extensamente, y los resultados muestran que los antiestrógenos mantienen la densidad ósea y previenen enfermedades cardiacas, la mayor inquietud a sido la posibilidad de carcinogénesis hepática y el riesgo de cáncer de endometrio. La identificación del sitio específico de acción del tamoxifeno es un paradigma que aun no esta completamente resuelto.

El desarrollo de los SERMs ejemplificado por el raloxifeno, a dado como resultado un éxito en la prevención de la osteoporosis. Este compuesto ha sido evaluado en más de 11,000 mujeres postmenopáusicas manteniendo la densidad ósea, disminuyendo la incidencia de cáncer de mama de manera significativa sin presentar efectos adversos en el endometrio. El raloxifeno está disponible como un preventivo para la osteoporosis en mujeres posmenopáusicas.

La clonación y secuenciación de los receptores de estrógenos ha permitido el desarrollo de un ratón knock out RE que complementa el trabajo pionero de Jensen y describe las consecuencias de la pérdida de  $RE\alpha$ . Sin embargo, recientemente se ha iniciado el estudio del segundo  $RE\beta$ , que seguramente proveerá respuestas adicionales a la acción de estrógenos y antiestrógenos. El desarrollo de anticuerpos monoclonales de  $RE\beta$ , la identificación de sitios blanco de esta proteína, la creación de ratones knock out  $RE\beta$  y  $RE\alpha,\beta$  identificarán nuevos blancos terapéuticos para modular las funciones fisiológicas.

La dirección de la principal investigación sobre la farmacología de antiestrógenos es el descubrimiento del mecanismos de especificidad de sitio blanco para la modulación de la respuesta estrogénica y antiestrogénica. La descripción de vías estimulatorias de estrógenos a través de una vía de transducción de señal AP-1  $RE\beta$ , no explica completamente la estrogenicidad de antiestrógenos, es necesario encontrar modelos que expliquen la suma de las consecuencias farmacológicas de la transducción de las señales a través de los receptores  $RE\alpha$  y  $RE\beta$ .

---

---

## 9. BIBLIOGRAFÍA

- ❖ Allen KE, Clark ER and Jordan VC (1980) Evidence for the metabolic activation of nonsteroidal antiestrogens: A study of structure-activity relationships *Dr J Pharmacol* 71:87-91.
- ❖ Allen E and Doisy EA (1923) An ovarian hormone: Preliminary reports on its Localization, extraction and partial purification and action in test animals. *JAMA* 81:810-821.
- ❖ Anker G, Linning PE, Ueland PM, Refsum H and Lien EA (1995) Plasma levels of the atherogenic amino acid homocysteine in post-menopausal women with breast cancer treated with tamoxifen. *Int J Cancer* 60:365-368.
- ❖ Anolik JH, Klinge CM, Bambara RA and Hilf R (1996) Differential impact of flanking sequences on estradiol vs 4-hydroxitamoxifen-liganded estrogen receptor binding to estrogen responsive DNA. *J Steroid Biochem Mol. Biol.* 46:713-730.
- ❖ Anzano MA, Peer CW, Smith JM, Mullen LT, Shrader MW, Logsdon DL, Driver CL, Brown CC, Roberts AB and Sporn MA (1996) Chemoprevention of mammary carcinogenesis in the rat: Combined use of raloxifene and 9-cis-retinoic acid. *J Natl Cancer Inst* 88:123-125.
- ❖ Arnold SF, Vorojeikina DP and Notides AC (1995) Phosphorylation of tyrosine 537 on the human estrogen receptor  $\beta$  required for binding to an estrogen-response element. *J Biol Chem* 270 :30205-30212.
- ❖ Assikis VJ and Jordan VC (1995) Gynecological effects of tamoxifen and the association with endometrial cancer. *Int J Gynecol Obstet* 49:241-257.
- ❖ Assikis VJ, Neven P, Jordan VC and Vergote I (1996) A realistic clinical perspective of tamoxifen and endometrial carcinogenesis. *Eur J Cancer* 32 :1464-1476.
- ❖ Avigan J, Steinberg D, Vroman HE, Thompson MJ and Mosettig E (1960) Studies of cholesterol biosynthesis: The identification of desmosterol in serum and tissues of animals and man treated with MER-29. *J Biol Chem* 235:3123-3126.
- ❖ Barakat RR (1997) Benign and hyperplastic endometrial changes associated with tamoxifen use. *Oncology* 11(Suppl 1):35-37.
- ❖ Barakat RR, Wong G, Curtin JD, Vlamis V and Hoskins WJ (1994) Tamoxifen use in breast cancer patients who subsequently develop corpus cancer is not associated with a higher incidence of adverse histological features. *Gynecol Oncol* 55:164-168.
- ❖ Benson JR, Wakefield LM, Baum M and Colletta AA (1996) Synthesis and secretion of transforming growth factor  $\beta$  isoforms by primary cultures of human breast tumour fibroblasts in vitro and their modulation by tamoxifen. *Br J Cancer* 74:352-358.

- 
- ❖ Berry M., Metzger D., Chambon P., 1990. Role of the two activating domains of the oestrogen receptor in the cell-type and promoter context dependent agonistic activity of the anti-oestrogen 4-hydroxytamoxifen. *EMBO J* 9:2811-2818.
  - ❖ Berthois Y, Katzenellenbogen JA and Katzenellenbogen BS (1986) Phenol red in tissue culture media is a weak estrogen: Implications concerning the study of estrogen responsive cells in culture. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:2496-2500.
  - ❖ Biegon A, Brewster M, Degani H, Pop E, Somjen D and Kaye AM (1996) A permanently charged tamoxifen derivative displays anticancer activity and improved tissue selectivity in rodents. *Cancer Res* 56:4328-4331.
  - ❖ Bilimoria MM, Assikis VJ and Jordan VC (1996a) Should adjuvant tamoxifen treatment be stopped at 5 years? *Cancer J Sci Am* 2:140-150.
  - ❖ Bilimoria MM, Assikis VJ, Muenzner HD, Lurain JR and Jordan VC (1996b) An analysis of tamoxifen-simulated human carcinomas for mutations in the AF-2 region of the estrogen receptor. *J Steroid Biochem Mol Biol* 58:479-488
  - ❖ Black LJ, Sato M, Rowley ER, Magee DE, Bekele A, Williams DC, Cullinan GJ, Bendele R, Kauffman RF, Bensch WR, Frolik CA, Termine JD and Bryant HU (1994) Raloxifene (LY139481 HCl) prevents bone loss and reduces serum cholesterol without causing uterine hypertrophy in ovariectomized rats *J Clin Invest* 93:63-69.
  - ❖ Boring CC, Squires TS, Tong T and Montgomery B (1994) Cancer Statistics, 1994. *CA Cancer J Clin* 44:7-26.
  - ❖ Bowler J, Lilley TJ, Pittman JD and Wakeling AE (1989) Novel steroidal pure antiestrogens. *Steroids* 54:71-99.
  - ❖ Bunone G, Briand P-A, Miksicsek RJ and Picard D (1996) Activation of the unliganded estrogen receptor in the EGF involves the MAP kinase pathway and direct phosphorylation. *EMBO J* 15:2174-2183.
  - ❖ Butta A, MacLennan K, Flanders KC, Sacks NP, Smith I, Mckinna A, Dowsett M, Wakefield LM, Sporn MB, Baum M and Colletta AA (1992) Induction of transforming growth factor beta 1 in human breast cancer in vivo following tamoxifen treatment. *Cancer Res* 52:4261-4264.
  - ❖ Bützow R, Fukushima D, Twardzik DR and Ruoslahti E (1993) A 60 kD protein mediates the binding of transforming growth factor- $\beta$  to cell surface and extracellular matrix proteoglycans. *J Cell Biol* 122:721-727.
  - ❖ Buzdar AU, Jonat W, Howell A, Jones SE, Blomqvist C, Vogel CL, Eierman W, Wolter JM, Azab M, Webster A and Plourde PV (1996) Anastrozole, a potent and selective aromatase inhibitor, versus megestrol acetate in postmenopausal women with advanced breast cancer:
-

---

Results of overview analysis of two phase three trials: Arimidex Study Group. *J Clin Oncol* 14:2000-2011.

- ❖ Brzozowski AM, Pike ACW, Dauter Z, Hubbard RE, Bonn T, Engstrom O, Ohman L, Greene GL, Gustafsson J-A and Carquist M (1997) Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature (Lond.)* 389:753-758.
- ❖ Carmichael PL, Ugwumadu AHN, Neven P, Herwe A J, Poon G K and Phillips DH (1996) Lack of genotoxicity of tamoxifen in human endometrium. *Cancer Res* 56:1475-1479.
- ❖ Carson-Jurica MA, Schrader WT and O'Malley BW (1990) Steroid receptor family: Structure and functions. *Endocr Rev* 11:201-220.
- ❖ Catherino WH and Jordan VC (1995) Increasing the number of tandem estrogen response elements increases the estrogenic activity of a tamoxifen analog. *Cancer Lett* 92:39-47.
- ❖ Chambraud B, Berry M, Redeuilh G, Chambon P and Baulieu EE (1990) Several regions of human estrogen receptor are involved in the formation of receptor-heat shock protein 90 complexes. *J Biol Chem* 265:20686-20691.
- ❖ Chander SK, McCague R, Lugmani Y, Newton C, Dowsett M, Jarman M and Coombes RC (1991) Pyrrolidino-4-iodotamoxifen and iodotamoxifen, new analogues of the antiestrogen tamoxifen for the treatment of breast cancer. *Cancer Res* 51:5851-5858.
- ❖ Chen JD and Evans RM (1995) A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature (Lond.)* 377:454-457.
- ❖ Chrivia JC, Kwok RP, Lamb N, Hagiwara M, Monminy MR and Goodman RH (1993) Phosphorylated CREB binds specifically to the nuclear protein CBP. *Nature (Lond.)* 365:855-859.
- ❖ Clark ER and Jordan VC (1976) Oestrogenic, anti-oestrogenic and fertility properties of a series of compounds related to ethamoxotriphenol (MER25). *Br J Pharmacol* 57:487-493.
- ❖ Clark R, Brunner N, Katz D, Clanz P, Dickson RE, Lippman ME and Kern F (1989a) The effects of constitutive production of TGF $\alpha$  on the growth of MCF-7 human breast cancer cells in vitro and in vivo. *Mol Endocrinol* 3:372-380.
- ❖ Clark R, Brunner N, Katzenellenbogen BS, Thompson EW, Norman MJ, Koppi C, Paik B, Lippman M E and Dickson RB (1989b) Progression of human breast cancer cells from hormone-dependent to hormone independent growth both in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:3649-3653.
- ❖ Comoglio A, Gibbs AH, White IN, Gant T, Martin EA, Smith LL, Gamarelo SR and DeMatteis F (1996) Effects Of tamoxifen feeding on metabolic activation of tamoxifen by the rhesus



- monkey: Does liver accumulation of inhibitory metabolites protect from tamoxifen-dependent genotoxicity and cancer? *Carcinogenesis* 17: 1687-1693.
- ❖ Constantino JP, Kuller LH, Ives DG, Fisher B and Dignam J (1997) Coronary heart disease mortality and adjuvant tamoxifen therapy. *J Natl Cancer Inst* 89:776-782.
  - ❖ Couse J.F., Lindzey J., Grandien K., Gustafsson J-A., Korach K.S., 1997. Tissue distribution and quantitative analysis of estrogen receptor- $\alpha$  (RE $\alpha$ ) and estrogen receptor- $\beta$  (RE $\beta$ ) messenger ribonucleic acid in the wild-type and RE $\alpha$ -knockout mouse. *Endocrinology* 138: 4613-4621.
  - ❖ Dickson RB and Lippman ME (1995) Growth factors in breast cancer. *Endocr Rev* 16:559-589.
  - ❖ Dodds EC and Lawson WA (1937) Simple aromatic oestrogenic agent with an activity of the same order as that of oestrone. *Nature* 139: 627.
  - ❖ Dodds EC and Lawson W (1936) Synthetic oestrogenic agents without the phenanthrene nucleus. *Nature* 137: 996.
  - ❖ Dodds EC and Lawson W (1937) Oestrogenic activity of p-hydroxy propenyl benzene (Anol) *Nature* 139:1068
  - ❖ Dodds EC, Golberg L, Lawson W and Robinson R (1938) Oestrogenic activity of certain synthetic compounds. *Nature* 141: 247-248.
  - ❖ Dodds EC, Lawson W and Noble R L (1938) Biological effects of a synthetic oestrogenic substance 4:4'-dihydroxy-a: B-diethylstilbene. *Lancet* 1: 1389-1391.
  - ❖ Dodds EC, Lawson W and Robinson R (1938) Oestrogenic activity of alkylated stilbestrols. *Nature* 142: 34.
  - ❖ Dodds EC, Lawson W and Robinson R (1938) Oestrogenic activity of esters of diethylstilbestrol. *Nature* 142: 211-212.
  - ❖ Dodds, E. C., Folley, S. J., Glascock, R. F., and Lawson, W (1958) The excretion of microgram doses of hexestrol by rabbits and rats. *Biochem. J.* 68: 161-167.
  - ❖ Dorfman, R. I., and Kinci, F. A. (1966) Uterotrophic activity of various phenolic steroids. *Acta Endocrinol.* 52: 619-626.
  - ❖ Emmens, C.W. (1947) Halogen-substituted oestrogens related to triphenylethylene. *J. Endocrinol.* 5: 170-173.
  - ❖ Garner DK. *Hormonal Action: Principles and Practice of endocrinology and Metabolism*. Second Edition, edited by Kenneth L. Becker. JB. Lippincott Company, Philadelphia, 1995, 20-34.

- ❖ Fournier B, Haring S, Kaye AM and Sonjen D (1996) Stimulation of creatine kinase specific activity in human osteoblast and endometrial cells by estrogens and anti-estrogens and its modulation of claciotropic hormones. *J Endocrinol* 150:275-285.
- ❖ Furr BJA and Jordan VC (1984) The pharmacology and clinical uses of tamoxifen. *Pharmacol Ther* 25:127-205.
- ❖ Frantz ID, Mobberley ML and Schroepfer GT (1996) Effects of MER-29 on the intermediate metabolism of cholesterol. *Prog Cardiovasc Disord* 2:511-518.
- ❖ Garg, S., Bindal, R. D., Durani, S., and Kapil, R. S. (1983) Structure-activity relationships of estrogens: a study involving cyclofenyl as the model compound. *J. Steroid. Biochem.* 18: 89-95.
- ❖ Ganz PA, Day R, Ware JE Jr, Redmond C and Fisher B (1995) Base-line quality-of- life asseament in the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Breast Cancer Prevention Trial. *J Natl Cancer Inst* 87:1372-1382.
- ❖ Glascock, R. F., and Hoekstra, W. G. (1959) Selective accumulation of tritium-labeled hexoestrol by the reproductive organs of immature female goats and sheep. *Biochem. J.* 72: 673-682.
- ❖ Goodman y Gilman (1996) Las bases Farmacológicas de la terapeútica. 1497-1527.
- ❖ Gorsch SM (1992) Immunohistochemical staining for transforming growth factor- beta associates with disease progression in human breast cancer. *Cancer Res* 52:6949-6952.
- ❖ Gorski J, Furlow JD, Murdoch FE, Fritsch M, Kaneko K, Ying C and Malayer JR (1993) Perturbations in the model of estrogen receptor regulation of gene expres- sion. *Biol Reprod* 48:8-14.
- ❖ Gradishar WJ and Jordan VC (1997) The clinical potential of new antiestrogeno. *J Clin Oncol* 15:480-489.
- ❖ Gylling 11, Pyrhonen S, Mantyla E, Maenpaa H, Kangas L and Miettinen TA (1995) Tamoxifen and toremifene lower serum cholesterol by inhibition of D8-cholestenol conversion to lathosterol in women with breast cancer. *J Clin Oncol* 13:2900-2905.
- ❖ Hanahan DJ, Daskalakis EG, Edwards T and Dauben HJ (1953) The metabolic pattern of 14C-diethylstilbestrol. *Endocrinology* 53:163-170.
- ❖ Han X and Liehr JG (1992) Induction of covalent DNA adducts in rodents by tamoxifen. *Cancer Res* 52:1360-1363.
- ❖ Hanstein B, Eckner R, DiRenzo J, Halamichi S, Liu R, Searcy B, Kurokawa R and Brown M (1996) p300 is a component of an estrogen receptor coactivator complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:11540-11545.

- 
- ❖ Hardcastle IR, Rowlands MG, Grimshaw R, Houghton J and Jarman M (1996) Homologues of idoxifene: Variation of oestrogen receptor binding and calmodulin antagonism with chain-length. *J Med Chem* 39:999-1004.
  - ❖ Hasman M, Rattel B and Loser R (1994) Preclinical data for droloxifene. *Cancer Lett* 84: 101-116.
  - ❖ Hayes DF, Van Zyl JA, Hacking A, Goedhals L, Bezwoda WR, Maillard JA, Jones SE, Vogel CL, Berus RF and Shemano I (1995) Randomized comparison of tamoxifen and two separate doses of toremifene in postmenopausal patients with metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 13:2556-2566.
  - ❖ Howell a, Defriend D, Robertson J, Blarney R and Walton P (1995) Response to a specific antiestrogen (ICI 182,780) in tamoxifen-resistant breast cancer. *Lancet* 345:29-30.
  - ❖ Howell A, DeFriend DJ, Robertson Jfr, Blarney RW, Anderson L, Anderson E, Sutcliffe FA and Walton P (1996) Pharmacokinetics, pharmacological and anti-tumour effects of the specific anti-oestrogen ICI 182, 780 in women with breast cancer. *Br J Cancer* 74:300-308
  - ❖ Jiang SY, Langan-Fabey SM, Stella AL, McCague R and Jordan VC (1992a) Point mutation of estrogen receptor (ER) in the ligand-binding domain changes; the pharmacology of antiestrogens in ER-negative breast cancer cells stably expressing complementary DNAs for ER. *Mol Endocrinol* 6:2167-2174.
  - ❖ Jiang SY, Parker CJ and Jordan VC (1993) A model to describe how a point mutation of the estrogen receptor alters the structure-function relationship of antiestrogens. *Breast Cancer Res Treat* 26:139-147.
  - ❖ Jiang SY, Wolf DM, Yingling JM, Chang C and Jordan VC (1992b) An estrogen receptor positive MCF-7 clone that is resistant antiestrogens and estradiol. *Mol Cell Endocrinol* 90:77-86.
  - ❖ Jeng MH, ten Dijke P, Iwata KK and Jordan VC (1993) Regulation of the levels of three transforming growth factor mRNAs by estrogen and their effects, on the proliferation of human breast cancer cells. *Mol Cell Endocrinol* 97:115-123.
  - ❖ Jensen EV and Jacobson HI (1962) Basic guides the mechanism of estrogen action. *Recent Prog Horm Res* 18:387-414.
  - ❖ Jensen EV and Jacobson HI (1960) Fate of steroidal estrogen in target tissues, in *Biological Activities of Steroids in Relation to Cancer* (Pincus G and Vollmer EP eds) pp 161-174, Academic Press, New York.
-

- 
- 
- ❖ Johnston SRD, Haynes BP, Sacks NPM, McKinna JA, Griggs LJ, Jarman M, Baum M, Smith IE and Dowsett M (1993a) Effect of oestrogen receptor status and time on the intra-tumoural accumulation of tamoxifen and N-desmethyltamoxifen following short-term therapy in human primary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 28:241-250.
  - ❖ Johnston SRD, Riddler S, Haynes BP, A'Hern R, Smith TE, Jarman M And Dowsett M (1997) The novel anti-oestrogen idoxifene inhibits the growth of human MCF-7 breast cancer xenografts and reduces the frequency of acquired antiestrogen resistance. *Br J Cancer* 75:804-809.
  - ❖ Jordan VC (1995a) Alternate antiestrogens and strategies for the prevention of breast cancer. *J Cell Biochem* 22:51-57.
  - ❖ Jordan VC. (1984) Biochemical pharmacology of antiestrogen action. *Pharmacol Rev* 30:245-276.
  - ❖ Jordan VC (1993) Current view of the use of tamoxifen for the treatment and prevention of breast cancer. Gaddum Memorial Lecture. *Br J Pharmacol* 110:507-517.
  - ❖ Jordan VC (ed) (1994) Long-term tamoxifen treatment for breast cancer. University of Wisconsin Press, Madison.
  - ❖ Jordan VC (ed) (1997a) Tamoxifen: A guide to clinicians and patients. PRR, Inc., Huntington, New York.
  - ❖ Jordan VC (ed) (1995b) Tamoxifen and the prevention of breast cancer. *Proc Soc Exp Biol Med* 208:144-149.
  - ❖ Jordan VC (ed) (1995c) Tamoxifen and tumorigenicity: A predictable concern. *J Natl Cancer Inst* 87:623-626.
  - ❖ Jordan VC (ed) (1997b) Tamoxifen: The herald of a new era of preventative therapeutics. *J Natl Cancer Inst* 89:747-749.
  - ❖ Jordan VC (ed) (1995c) Tamoxifen treatment for breast cancer. Concept to gold standard. *Oncology* 11:7-13.
  - ❖ Jordan VC (1995d) What if tamoxifen had been found to produce liver tumors in rats in 1973? *Ann Oncol* 6:29-43.
  - ❖ Jordan VC and Assikis VJ (1995) Tamoxifen and endometrial cancer: clearing up the controversy. *Clin Cancer Res* 1:467-472.
  - ❖ Jordan VC, Dix C J, Naylor KE, Prestwich G and Rowsby L (1978) Non-steroidal antiestrogens: Their biological effects and potential mechanisms of action. *J Toxicol Environ Health* 4:364-390.

- 
- ❖ Jordan VC, Fritz NF, Langan-Fahey SM, Thompson M and Tormey DC (1991a) Alteration of endocrine parameters in premenopausal women with breast cancer during long-term adjuvants therapy with tamoxifen as a single agent. *J Natl Cancer Inst* 83:1488-1491.
  - ❖ Jordan VC and Lieberman ME (1984) Estrogen-stimulated prolactin synthesis in vitro classification of agonists, partial agonist and antagonist actions base on structure. *Mol Pharmacol* 26:279-285.
  - ❖ Jordan VC, Lieberman ME, Cormier E, Koch R, Bagley J and Ruenitz P (1984) Structural requerements for the pharmacological activity non steroidal antiestrogens in vitro. *Mol Pharmacol* 26:272-278.
  - ❖ Jordan VC, McGregor JI and Tonetti DA (1997) Tamoxifen: From breast cancer therapy to the desing of a postmenopausal hormone replacement therapy. *Osteoporos Int.* 1:S52-S57.
  - ❖ Jordan VC and Murphy CS (1990) Endocrine pharmacology of antiestrogens as antitumor agents. *Endocr Rev* 11:578-610.
  - ❖ Kato S, Endoh H, Masuhiro Y, Kitamoto T, Uchiyama S, Sasaki H, Masushige S, Gotoh Y, Nishida E, Kawashima H, Metsger D and Chambon P (1995) Activation of the estrogen receptor though phosphorylation by mitogen-activated protein kinase. *Science (Wash. DC)* 270:1491-1494.
  - ❖ Katzenellenbogen BS and Korach KS (1997) A new actor in the estrogen receptor drama-enter Erb. *Endocrinology* 138:861-862.
  - ❖ Katzenellenbogen BS, Montano MM, Le Goff P, Schodin DJ, Kraus WL, Bhardwaj B and Fujimoto N (1995) Antiestrogens: Mechanisms and actions in target cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 53: 387-393.
  - ❖ Katzenellenbogen JA, O'Malley BW and Katzenellenbogen BS (1996) Tripartite steroid hormone receptor pharmacology: Interaction with multiple effector site as a basis for the cell- and promoter-specific action of these hormones. *Mol Endocrinol* 10: 119-131.
  - ❖ Kawamura I, Lacey E, Mizota T, Tsujimoto S, Nishigaki F, Manda T and Shimomura K (1994) The effects of droloxifene on the insulin-like growth factor-I-stimulated growth of breast cancer cells. *Anticancer Res* 14: 427-431.
  - ❖ Ke HZ, Chen HK, Pirie CM, Simmons HA, Ma YF, Jee WS and Thompson DD (1995a) Effects of droloxifene on prevention of cancellous bone turnover in the axial skeleton of aged, ovariectomized rats. *Bone* 17: 491-496.
  - ❖ Ke HZ, Simmons HA, Pirie CM, Crawford DT and Thompson DD (1995b) Droloxifene, a new estrogen antagonist/agonist, prevents bone loss in ovariectomized rats. *Endocrinology* 136: 2435-2440.
-

- 
- 
- ❖ Kee B, Arias J and Montminy MR (1996) Adaptor-mediated recruitment of RNA polymerase II to a signal-dependent activator. *J Biol Chem* 271: 2373-2375.
  - ❖ Kirby TJ, Achorn RWP, Perry HO and Winkelmann RK (1962) Cataract formation after triparanol therapy. *Arch Ophthalmol* 68:486-491
  - ❖ Kirk J, Syed SK, Harris AL, Jarman M, Roufogalis BD, Stratford IJ and Carmicheal J (1994) reversal of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance by pure antiestrogens and noveltamoxifen derivatives. *Biochem Pharmacol* 48:277-285.
  - ❖ Klinge Cm, Bambara RA and Hilf R (1992) Antiestrogen-liganded estrogen receptor interaction with estrogen responsive element DNA in vitro. *J Steroid Biochem Mol Biol* 57:51-66.
  - ❖ Knabbe C, Kopp A, Hilgers W, Lang D, Muller V, Zugmaier G and Jonat W (1996) Regulation and role of TGF beta production in breast cancer. *Ann. N Y Acad Sci* 784:263-276
  - ❖ Kopp A, Jonat W, Schmahl M and Knabbe C (1995) Transforming growth factor beta 2(TGF-beta2) levels in plasma of patients with metastatic breast cancer treated with tamoxifen. *Cancer Res* 55:4512-4515.
  - ❖ Korach KS, Couse JF, Cuertis SW, Wasburn TF, Lindzey J, Kimbro KS, Eddy EM, Migliaccio S, Snedeker SM, Lubahn DB, Schomberg DW and Smith EP (1996) Estrogen receptor gene disruption: Molecular characterization and experimental and clinical phenotypes. *Recent Prog Horm Res* 51:159-186.
  - ❖ Kraus W.L., McInerney E.M., Katzenellenbogen B.S., 1995. Ligand-dependent transcriptionally productive association of the amino- and carboxyl-terminal regions of a steroid hormone nuclear receptor, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 12314-12318.
  - ❖ Kristensen B, Ejlersen B, Dalgaard P, Larsen L, Holmegaard SN, Transbol I and Mouridsen HT (1994) Tamoxifen and bone metabolism in postmenopausal low risk breast cancer patients: A randomized study. *J Clin Oncol* 12:992-997.
  - ❖ Kuiper GG and Brinkmann AO (1994) Steroid hormone receptor phosphorylation: Is there a physiological role? *Mol Cell Endocrinol* 100:103-107
  - ❖ Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Haggblad J, Nilsson S and Gustafsson J-A (1997) Comparison of ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptor alpha and beta. *Endocrinology* 138:863-870.
  - ❖ Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S and Gustafsson J-A (1996) Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:5925-5930.

- 
- ❖ Kurokawa R, Soderstrom M, Hsrlein AJ, Halachmi S, Brown M, Rosenfeld MG and Glass CK (1993) Polarity-specific activities of retinoic acid receptors determined by a co-repressor. *Nature (Lond)* 377:451-454
  - ❖ Kwok RP, Lundblad JR, Chrivia JC, Richards JP, Bachinger HP Brennan RG, Roberts SG, Green MR and Goodman Rh (1994) Nuclear protein CBP is a coactivator for the transcription factor CREB. *Nature (Lond)*. 370:223-226
  - ❖ Laughlin RC and Carey TF (1962) Caracts in patients treated with triparanol *JAMA* 181:339-340.
  - ❖ LeGoft p, Montano MM, Schodin DJ and Katzenellenbogen BS (1994) Phosphorylation of the human estrogen receptor: Identification of hormone-regulated sites and examination of their influence on transcriptional activity. *J Biol Chem* 269:4458-4466.
  - ❖ Lerner LJ (1964) More antagonists: Inhibitors of specific activities of estrogen and androgen. *Recent Prog Horm Res* 20:435-490.
  - ❖ Lerner LJ (1981) The first non-steroidal antiestrogen-MER-25, in *Non-Steroidal Antiestrogens: Molecular and Antitumour Activity* (Sutherland RL and Jordan VC eds) pp 1-16, Sydney, Academic Press.
  - ❖ Lerner LJ, Holthaus JF and Thompson CR (1958) A non-steroidal estrogen antagonist 1-(p-2-diethylaminoethoxyphenyl)-1-phenyl-2-p-methoxyphenyl-ethanol. *Endocrinology* 63:295-318.
  - ❖ Lerner LJ and Jordan VC (1990) Development of antiestrogens and their use in breast cancer: Eighth Cain Memorial Lecture. *Cancer Res* 50:4177-4189.
  - ❖ Lahooti H, White R, Danielian PS and Parker MG (1994) Characterization of ligand-dependent phosphorylation of the estrogen receptor. *Mol Endocrinol* 8:182-188.
  - ❖ Levenson AS, Catherino WH and Jordan VC (1997) Estrogenic activity is increased for an antiestrogen by natural of the estrogen receptor. *J Steroid Biochem Mol Biol* 60:261-268.
  - ❖ Levenson AS and Jordan VC (1998) The key to the antiestrogenic mechanism of raloxifene is amino acid 351 (Aspartate) in the estrogen receptor. *Can Res* 58: 1872-1875.
  - ❖ Levenson AS, Tonetti DA and Jordan VC (1998) The oestrogen-like effects of 4-hydroxytamoxifen on induction of transforming growth factor alpha mRNA in MDA-MB-231 breast cancer cells stably expressing the oestrogen receptor. *Br J Cancer*, in press.
  - ❖ Li S, Levesque C, Geng C-S, Yan X and Labrie F (1995) Inhibitory effects of medroxyprogesterone acetate (MPA) and the antiestrogen EM-219 on estrone (E1)-stimulated growth of dimethylbenz(a)anthracene (DMBA)-induced mammary carcinoma in the rat. *Breast Cancer Res Treat* 34: 147-159.
-

- ❖ Lieberman ME; Gorski J and Jordan VC (1983a) An estrogen model to describe the regulation of prolactin synthesis by antiestrogens in vitro. *J Biol Chem* 258: 4741-4745.
- ❖ Lieberman ME, Jordan VC, Fritsch M, Santos MA and Gorski J (1983b) Direct and reversible inhibitors of estradiol-stimulated prolactin synthesis.
- ❖ Lippman ME and Bolan G (1975) Oestrogen-responsive human breast cancer in long term tissue culture. *Nature (Lond.)* 256: 595-593.
- ❖ Lippman ME, Bolan G and Huff K (1976) The effects of estrogens and antiestrogens on hormono-responsive breast cancer in long term tissue culture. *Cancer Res* 36:4595-4601.
- ❖ Luo S, Martel C, Gauthier S, Mérand Y, Bélanger A, Labrie C and Labrie F (1997a) Long-term inhibitory effects of a novel antiestrogen on the growth of ZR-75-1 and MCF-7 human breast cancer tumors in nude mice. *Int J Cancer* 73:381-389.
- ❖ Luo S, Martel C, Sourla A, Gauthier S, Mérand Y, Bélanger A, Labrie C and Labrie F (1997b) Comparative effects of 28-day treatment with the new antiestrogen EM-800 and tamoxifen on estrogen-sensitive parameters in the intact mouse. *Int J Cancer* 73:381-389.
- ❖ Luo S, Sourla A, Labrie C, Bélanger A and Labrie F (1997c) Combined effects of dehydroepiandrosterone and EM-800 on bone mass, serum lipids, and in the development of dimethylbenz(a)anthracene (DMBA)-induced mammary carcinoma in the rat. *Endocrinology* 138:4435-4444.
- ❖ Luo S, Stojanovic M, Labrie C and Labrie F (1997d) Inhibitory effect of the novel antiestrogen EM-800 and medroxyprogesterone acetate (MPA) on estrogen-stimulated growth of dimethylbenz(a)anthracene (DMBA)-induced mammary carcinoma in the rat. *Int J Cancer* 73:580-586.
- ❖ Love RR, Barden HS, Mazess R, Epstein S and Chappell Rj (1994) Effect of tamoxifen in lumbar spine bone mineral density in postmenopausal women after 5 years. *Arch Int Med* 154:2585-2586.
- ❖ Love RR, Mazess RB, Barden HS, Epstein S, Newcomb PA, Jordan VC, Carbone PP and De Mets DL (1992) Effects of tamoxifen on bone mineral density in postmenopausal women with breast cancer. *N Engl J Med* 326:885-886.
- ❖ Love RR, Wiebe DA, Feyzi JM, Newcomb PA and Chappell RJ (1995) Effects of tamoxifen on cardiovascular risk factors in postmenopausal women after 5 year of treatment. *J Natl Cancer Inst* 86:1534-1539.
- ❖ Lykkesfeldt AE, Larsen JK, Christensen IJ and Briand P (1984) Effects of the antiestrogen tamoxifen on the cell cycle kinetics breast cancer cell line, MCF-7. *Br J Cancer* 49:717-722.



- 
- ❖ McDonald CC; Alexander FE, Whyte BW, Forrest AP, McDonald CC and Stewart HJ (1995) Cardiac and vascular morbidity in women receiving adjuvant tamoxifen for breast cancer in a randomized trial. *Br. Med J* 311:977-980.
  - ❖ McDonald CC and Stewart HJ (1991) Fatal myocardial infarction in the Scottish tamoxifen trial. *Br Med J* 303: 435-437.
  - ❖ McDonnell DP, Clemm DL, Hermann T, Goldman ME and Pike JW (1995) Analysis of estrogen receptor function reveals three distinct classes of antiestrogens. *Mol Endocrinol* 9 659-669
  - ❖ Mahfoudi A, Roulet E, Dauvois S, Parker MG and Wahli W (1995) Specific mutations in the estrogen receptor change the properties of antiestrogens to pure antagonists. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:4206-4210.
  - ❖ Martin EA; Rich KJ, White IN, Woods KL, Powles TJ and Smith LL (1995) 32P-Posty labeled DNA adducts in liver obtained from women treated with tamoxifen. *Carcinogenesis* 16:1651-1654.
  - ❖ Moorthy B, Sriram P, Pathak D, Bodell WJ and Randerath K (1996) Tamoxifen metabolic activation: Comparison of DNA adducts formed by microsomal and chemical activation of tamoxifen and 4-hydroxytamoxifen with DNA adducts formed in vivo. *Cancer Res* 56:53-57.
  - ❖ Micheli, R. A., Booth, A. N., Livingston, A. L., and Bickoff, E. M. (1962) Coumestrol, plant phenolics, and synthetic estrogens: a correlation of structure and activity. *J. Med. Pharm. Chem.* 5:321-335.
  - ❖ Mosselman S., Polman J., Dijkema R., 1996. ER  $\beta$ : identification and characterization of novel human estrogen receptor. *FEBS Lett.* 392: 49-53.
  - ❖ Norris JD, Fan D, Wagner BL and McDonnell DP (1996) Identification of the sequences within the human complement promoter required for estrogen responsiveness provides insight into the mechanism of tamoxifen mixed agonist activity. *Mol Endocrinol* 10:1605-1616.
  - ❖ Nuwaysir EF, Dagget DA, Jordan VC and Pitot HC (1996) Phase II enzyme expression in rat liver in response to the antiestrogen tamoxifen. *Cancer Res* 56:3704-3710.
  - ❖ Orti E, Bodwell JE and Munck A (1992) Phosphorylation of steroid hormone receptors. *Endocr Rev* 13: 105-128.
  - ❖ Osborne CK, Coronado-Heinsohn EB, Hilsenbeck SG, McCue BL, Wakeling AE, McClelland RA, Manning DL and Nicholson RI (1995) Comparison of the effects of a pure steroidal antiestrogen with those of tamoxifen in a model of human breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 87:746-750.
-

- 
- ❖ Osborne CK, Jarman M, McCague R, Coronado EB, Hilsenbeck SG and Wakeling AE (1994) The importance of tamoxifen metabolism in tamoxifen-stimulated breast tumor growth. *Cancer Chemother Pharmacol* 34:89-95.
  - ❖ Paech K, Webb P, Kuiper GGJM, Nilsson S, Gustafsson J-A, Kushner PJ and Scanlan (1997) Differential ligand activation of estrogen receptors ER $\alpha$  and ER $\beta$  at AP1 sites. *Science (Wash. DC)* 277:1508-1510.
  - ❖ Paliwal JK and Gupta RC (1996) Tissue distribution and pharmacokinetics of centchoroman. *Drug Metab Dispos* 24:148-156.
  - ❖ Perry RR, Kang Y and Greaves B (1995) Effects of tamoxifen on growth and apoptosis of estrogen-dependent and-independent human breast cancer cell. *Ann Surg Oncol* 2:238-245.
  - ❖ Pink JJ and Jordan VC (1996) Models of estrogen receptor regulation by estrogens and antiestrogens in breast cancer cell lines. *Cancer Res* 56:2321-2330.
  - ❖ Phillipis DH, Carmichael PL, Hewer A, Cole KJ, Hardcastle IR, Poon GK, Deogh A and Strain AJ (1996a) Activation of tamoxifen and its metabolite  $\alpha$ -hydroxytamoxifen to DNA-binding products: Comparisons between human, rat and mouse hepatocytes. *Carcinogenesis* 17:89-94.
  - ❖ Phillipis DH, Carmichael P, Hewer A, Cole KJ and Poon GK (1994a)  $\alpha$ -Hydroxytamoxifen, a metabolite of tamoxifen with exceptionally high DNA-binding activity in rat hepatocytes. *Cancer Res* 54:5518-5522.
  - ❖ Phillips DH, Hewer A, Grover PL, Poon GK and Carmichael PL (1996b) Tamoxifen does not form detectable DNA adducts in white blood cells of breast cancer patients. *Carcinogenesis* 17:1149-1152.
  - ❖ Phillips DH, Hewer A, White INH and Farmer PB (1994b) Co-chromatography of a tamoxifen epoxide-deoxyguanylic acid adduct with a major DNA adduct formed in the livers of tamoxifen-treated rats. *Carcinogenesis* 15:793-795.
  - ❖ Phillips DH, Potter GA, Horton MN, Hewer A, Crofton-Sleigh C, Jarman M and Venitt S (1994c) Reduced genotoxicity of [A5-ethyl]-tamoxifen implicates  $\alpha$ -hydroxylation of the ethyl group as a major pathway of tamoxifen activation to a liver carcinogen. *Carcinogenesis* 15:1487-1492.
  - ❖ Potter GA, McGague R and Jarman M (1994) A mechanistic hypothesis for DNA adduct formation by tamoxifen following oxidative metabolism. *Carcinogenesis* 15:439-442.
  - ❖ Powles TJ, Hickish T, Kanis JA, Tidy A and Ashley S (1996) Effect of tamoxifen on bone mineral density measured by dual-energy x-ray absorptiometry in healthy premenopausal and postmenopausal women. *J Clin Oncol* 14:78-84.
-

- ❖ Raushning w and Pritchard KI (1994) Droloxifene, a new antiestrogen: Its role in metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 31:83-94.
- ❖ Rutqvist LE and Matteson A (1993) Cardiac and Thromboembolic morbidity among postmenopausal women with early-stage breast cancer in a randomized trial of tamoxifen. The Stockholm Breast Cancer Study Group. *J Natl Cancer Inst* 85:1398-1406.
- ❖ Saarto T, Blomqvist C, Ehnholm C, Taskinen MR and Elomaa I (1996) Antiatherogenic effects of adjuvant antiestrogens: A randomized trial comparing the effects of tamoxifen and toremifene on plasma lipid levels in postmenopausal women with node-positive breast cancer. *J Clin Oncol* 14:29-433.
- ❖ Saarto T, Blomqvist C, Valimaki M, Makela P, Sarna S and Elomaa I (1997) Clodronate improves bone mineral density in post-menopausal breast cancer patients treated with adjuvant antioestrogens. *Br. J Cancer* 75:602-605.
- ❖ Simard J, Labrie C, Bélanger A, Gauthier S, Singh SM, Mérand Y and Labrie f (1997a) Characterization of the effects of the novel non-steroidal antiestrogen EM-800 on basal and estrogen-induced proliferation of T47D,ZR-75-1 and MCF-7 human breast cancer cells in vitro. *Int J Cancer*. 73:104-112.
- ❖ Simard J, Sanchez R, Poirier D, Gauthier S, Singh SM, Mérand Y, Bélanger A, Labrie C and Labrie F (1997b) Blockade of the stimulatory effect of estrogens, OH-tamoxifen, OH-toremifene, droloxifene and raloxifene on alkaline phosphatase activity by the antiestrogen EM-800 in human endometrial adenocarcinoma inshikawa cell. *Cancer Res* 57:3494-3497
- ❖ Scheele WH, Symanowsky SM, Neale S, Shah a, Lafortune M and Fugere P (1997) Raloxifene does not cause stimulatory effects on the uterus in healthy postmenopausal women. *Endocr Soc.* 79:498.
- ❖ Smith CL, O-ate SA, Tsai M -J and O'Malley BW (1996) CREB binding protein acts synergistically with steroid receptor coactivator-1 to enhance steroid receptor-dependent transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:8884-8888.
- ❖ Steinberg D, Avigan J and Feigelson EG (1961) Effects of triparanol (MER-29) on cholesterol biosynthesis and on blood sterol levels in man. *J Clin Invest* 40:884-888.
- ❖ Tang MX, Jacobs P, Stern Y, Marder K, Schofield P, Garland B, Andrews H and Mayeux R (1996) Effect of oestrogen during menopause on risk and age at onset of Alzheimers diseasa. *Lancet* 348:429-433.
- ❖ Tang Z, Treilleux I and brown M (1997) A transcriptional enhancer required for the differential expression of the human estrogen receptor in breast cancers. *Mol. Cell Biol.* 17:1274-1280.

- 
- ❖ Tate, A. C., Greene, G. L., DeSombre, E. R., Jensen, E. V., and Jordan, V. C. (1984) Differences between estrogen- and antiestrogen-receptor complexes of human breast tumors identified with an antibody raised against the estrogen receptor. *Cancer Res* 44: 391-395.
  - ❖ Tomas E, Kauppila A, Blanco G, Apaja-Sarkkinen M and Laatikainen T (1995) postmenopausal breast cancer patients. *Gynecol Oncol*. 59:261-266.
  - ❖ Tonetti DA and Jordan Vc (1995) Possible mechanisms in the emergence of tamoxifen-resistant breast cancer. *Anticancer Brugs* 9:498-507.
  - ❖ Tonetti DA and Jordan VC (1996) The development of targeted antiestrogens to prevent diseases in women. *Mol Med Today* 2:218-223.
  - ❖ Tremblay GB, Tremblay A, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Labrie F and Giguere V (1997) Cloning, chromosomal localization, and functional analysis of the murine estrogen receptor. *Mol Endocrinol* 11:353-365.
  - ❖ Tsai MJ, Clark JH, Scharader W, O'Malley, BW., 1995. Mechanisms of action of hormones that act as transcription-regulatory factors. E: *Molecular endocrinology: basic concepts and clinical correlations*. Wentraub BD (Ed) Raven Press, Ltd NY. pp 55-94.
  - ❖ Twombly GH and Shoenevaldt EF (1951) Tissue localization and excretion routes of radioactive diethylstilbestrol. *Cancer* 4:296-302.
  - ❖ Tzukerman M.T., Esty A., Santiso-Mere D., Danielian P., Parker M.G., Stein R.B., Pike J.W., McDonnell D.P., 1994. Human estrogen receptor transactivational capacity is determined by both cellular and promoter context and mediated by two functionally distinct intramolecular regions. *Mol Endocrinol*. 8:21-30.
  - ❖ Van Roozendaal CE, Klijn JG, van Ooijen B, Claassen C, Eggermont AM, Henzen-Logmans SC and Foekens JA (1995) Transforming growth factor beta secretion from primary breast cancer fibroblasts. *Mol Cell endocrinol* 111:1-6.
  - ❖ Van de Velde P, Nique F, Bouchoux F, Bremaud J, Hameau MC, Lucas D, Moratille C, Viet S, Philibert D and Teutsch G (1994) RU 58,668, a new pure antiestrogen inducing a regression of human mammary carcinoma implanted in nude mice. *J Steroid Biochem Mol Biol* 48:187-196.
  - ❖ Van de Velde P, Nique F, Planchon P, Prevost G, Bremaud J, Hameau MC, Maguieu V, Philibert D and Teutsch G (1996) RU 58668: Further in vitro and in vivo pharmacological data related to its antitumoral activity. *J Steroid Biochem Mol Biol* 59:449-4570.
  - ❖ Von Sallmann L, Grimes P and Collins E (1963) Triparanol-induced cataracts in rats. *Arch Ophthalmol* 70:1128-1136.
-

- ❖ Wakeling AE (1994) A new approach to breast cancer therapy: Total estrogen ablation with pure antiestrogens, in Long-Term Tamoxifen Treatment for Breast Cancer Jordan VC ed pp 219-234. University of Wisconsin Press, Madison.
- ❖ Wakeling AE and Bowler J (1988) antiestrogens without partial agonist activity J Steroid Biochem 31:645-653.
- ❖ Welshons WV, Wolf MF, Murphy CS and Jordan VC (1988) Estrogenic activity of phenol red Mol Cell Endocrinol 57:169-178.
- ❖ Watts CKW, Brandy a, Sarcevic B, deFacio A, Musgrove EA and Sutherland RL (1995) Antiestrogen inhibition of cell cycle progression in breast cancer cells is associated with inhibition of cell cycle progression in breast cancer cells in noblastoma protein phosphorylation. Mol Endocrinol 9:1804-1813.
- ❖ Webb P, Lopez Gn, Uht RM and Kushner PJ (1995) Tamoxifen activation of the estrogen receptor/AP-1 pathway: Potential origin for the cell-specific estrogen-like effects of antiestrogens. Mol Endocrinol 9:443-456.
- ❖ Wilken NR, Sarcevic B, Musgrove EA and Sutherland RL (1996) Differential effects of retinoids and antiestrogens on cell cycle progression and cell cycle regulatory genes in human breast cancer cells. Cell Growth Differ 7:65-74.
- ❖ William CI, Stancel GM., 1996. Estrogenos y progestágenos. En: Las bases farmacológicas de la terapéutica. Novena edición. Harman JG, Limbird LE, Molinoff PB, Ruddon RW, Goodman Gilman A (eds). México.
- ❖ Wiseman H and Lewis DFV (1996) The metabolism of tamoxifen by human cytochromes P450 is rationalized by molecular modelign of the enzyme-substrate interactions. Potential importance to its proposed anti-carcinogenic/carcinogenic actions. Carcinogenesis 17:1357-1360.
- ❖ Yang NN, Bryant HU, Hardikar Ssato M, Galvin RJ, Glasebrook AL and Termine JD (1996a) estrogen and raloxifene stimulate transforming growth factor-beta 3 gene in rat bone: A potential mechanism for estrogen- or raloxifene-mediated bone maintenance. Endocrinology 137:2075-2084.
- ❖ Yang NN; Venugopalan M, Hardikar S and Glasebrook A (1997) Correction: Raloxifene response needs more than an element. Science (Wash. DC) 275:1249.
- ❖ Yang NN, Venugopalan M, Hardikar S and Gasebrook A (1996b) Identification of an estrogen response element activated by metabolites of 17 $\beta$ -estradiol and raloxifen. Science (Wash, DC) 273:1222-1225.

- ❖ Ylikomi T, Bocquel MT, Berry M, Gronemeyer H and Chambon P (1992) Cooperation of proto-signals for nuclear accumulation of estrogen and progesterone receptors. *EMBO J* 11:3681-3694.
- ❖ Zondek B and Bergman C (1938) Phenol methyl ethers as oestrogenic agents. *Biochem J* 32:641-645.