



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

**“CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE ALFA-FETOPROTEÍNA
UNIDA A UNA PROTEÍNA VERDE FLUORESCENTE (GFP) EN
CÉLULAS DERIVADAS DE CÁNCER DE MAMA (MCF-7)”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

(BIOLOGIA EXPERIMENTAL)

P R E S E N T A:

JOSÉ MANUEL RAMÍREZ JARAMILLO

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DRA. ELIZABETH LANGLEY McCARRON

**COMITÉ TUTOR: DR. JESÚS ADOLFO GARCIA SÁINZ
DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA**

México D.F.

SEPTIEMBRE 2012



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.



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

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 26 de febrero de 2007, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL) del (la) alumno (a) RAMÍREZ JARAMILLO JOSÉ MANUEL con número de cuenta 92082928 con la tesis titulada: "CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE ALFA-FETOPROTEÍNA UNIDA A UNA PROTEÍNA VERDE FLUORESCENTE (GFP) EN CÉLULAS DERVADAS DE CÁNCER DE MAMA (MCF-7)", realizada bajo la dirección del (la) DRA. ELIZABETH LANGLEY McCARRON:

Presidente:	DR. LUIS ARTURO BAIZA GUTMAN
Vocal:	DR. JESÚS ADOLFO GARCÍA SÁINZ
Secretario:	DRA. ELIZABETH LANGLEY McCARRON
Suplente:	DR. MARCO ANTONIO CERBÓN CERVANTES
Suplente	DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA

De acuerdo con lo anterior, el(a) alumno(a) se acogió a la nueva normatividad, con base en el artículo QUINTO TRANSITORIO en apego a lo establecido en el Artículo 25 del Reglamento General de Estudios de Posgrado (9 octubre de 2006).

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

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F. a 22 de agosto de 2012.

M. del Coro Arizmendi
Dra. María del Coro Arizmendi Arriaga
Coordinadora del Programa

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado de Ciencias Biológicas de la UNAM, por la atención y la oportunidad que me brindó durante todo el desarrollo de la maestría.

A CONACYT por el apoyo económico con la beca con número de registro 182952.

A mi Jefa de proyecto la Dra. Elizabeth Langley McCarron.

A mi comité tutor: Dr. Jesús Adolfo García Sáinz; Dr. Alejandro Zentella Dehesa que me dieron valiosos consejos que contribuyeron a la culminación de este proyecto de investigación.

AGRADECIMIENTOS A TITULO PERSONAL

La persona que merece el mérito de este trabajo y que le estoy muy agradecido por habérmelo confiado, mi jefa la Dra. Elizabeth Langley McCarron que me dio toda su confianza, le agradezco por toda su paciencia y consejos que me han brindado desde hace varios años que tengo el privilegio de conocerla y que han influido en mi formación como futuro investigador, quisiera agradecer de igual forma al posgrado en Ciencias Biológica por toda su atención, fue parte importante para culminar este trabajo, a la Facultad de Ciencias así como a toda la UNAM que desde que ingrese se ha convertido es mi segunda casa, a mi comité tutor: Dr. Jesús Adolfo García Sáinz y al Dr. Alejandro Zentella Dehesa, así como a mis revisores: Dr. Marco Antonio Cerbón y al Dr. Luis Arturo Baiza Gutman, les agradezco de antemano su atención que tuvieron para conmigo, al Dr. Misael Uribe que me abrió las puertas de la Institución Medica Sur donde encontré a un excelente equipo de trabajo, muy en especial le doy las gracias totales a mi jefe Dr. Jorge Albores Saavedra por toda la confianza, consejos e impulso que me ha dado para convertirme en parte de su equipo de trabajo y de investigación así como a mis compañero y amigos patólogos: Dr. Oscar Díaz, Dr. Mario Pérez-Peña; Dr. Fredy Chamblé y a la Dra. Isabel Lavenat además de mis amigos Marco Cubilla Punaro, Germán Gutiérrez y Antonio González que en el momento mas complicado siempre conté con ellos.

DEDICATORIA

A la persona que ha estado conmigo desde siempre mi mamá Luz María Jaramillo Flores a mi hermana Angélica que es como mi papá y mamá al mismo tiempo, a mis hermanos: Ricardo, Edgar, José y Alberto.

En lo personal tengo que decir que jamás me he dejado doblegar por nada he tenido las ganas y el coraje por salir adelante como buen Atlantista, a pesar de todo los obstáculos concluyo este trabajo experimental esperando que vengan más y pueda seguir contribuyendo a la investigación científica del país.

Gracias a todas esas personas que en algún momento cruzaron por mi vida, algunos aportaron y se quedaron otros se fueron pero de igual forma no los olvidare. Mención aparte para todos mis amigos del Atlante en especial a los Radicales como olvidar tantas alegrías y penas, a mis amigos Rockers no me olvido de ustedes que tan buenos momentos me han hecho pasar en especial para los que forman o formaron parte de mi grupo Kaotik Xoda.

Finalmente y en especial le dedico este trabajo a mi papá donde quiera que se encuentre, el me enseñó a seguir al más grande amor de mi vida que se convirtió en mi esposa que no abandono ni abandonare hasta el último día de mi vida, y con esta frase lo resumo todo:
“Gracias mi viejo por haberme hecho ATLANTISTA”

*“AWANTE ATLANTE, ORGULLO DEL PUEBLO SIMBOLO DEL D.F.”
LES GUSTE O NO LES GUSTE LES CUADRE O NO LES CUADRES.....*

INDICE

Pág.

AGRADECIMIENTOS.....	3
AGRADECIMIENTO A TITULO PERSONAL.....	4
DEDICATORIA.....	5
ABREVIATURAS.....	8
ÍNDICE DE FIGURAS.....	9
ÍNDICE DE TABLAS.....	10
RESUMEN.....	11
ABSTRACT.....	12

ANTECEDENTES

1. Estrógenos.....	13
1.1 Función de los Estrógenos.....	13
1.2 Receptores de Estrógenos.....	13
1.3 Regulación de la Transcripción Génica Mediada por el RE.....	14
1.4 Mecanismo de Acción de los Estrógenos.....	15
1.4.1 Mecanismo Clásico.....	16
1.4.1 Activación Independiente de EREs.....	16
1.5 Efectos No Genómicos (ENG) de los Estrógenos.....	17
1.6 Intercomunicación del RE con otras Vías de Señalización.....	18
1.7 Cáncer de Mama y Relación con la Regulación del RE.....	20
1.8 Receptores de Membrana blanco tratamiento contra Ca. Mama.....	21
2. Alfa Fetoproteína en Cáncer de Mama.....	23
2.1 Generalidades.....	23
2.2 Familia Estructural.....	24
2.3 Variantes Genéticas.....	25
2.4 Formas Intermedias Desnaturalizadas (MGF).....	26
2.5 AFP Como Anti-cancerígeno.....	27
2.6 Evidencias que Apuntan la existencia de un Receptor para AFP.....	30

OBJETIVO

1. Objetivos Particulares.....	32
--------------------------------	----

MATERIAL Y MÉTODO

1. Clonación de AFP unida a GFP.....	33
2. Clonación en el Vector de Destino.....	34
3. Transfección en Células COS-7.....	35
4. Lisis Celular.....	36
5. Precipitación con Sulfato de Amonio a 4 °C.....	36
6. Western Blot.....	36

7. Determinación de la Actividad de las Clonas.....	37
7.1 Ensayo de Proliferación.....	37
7.2 Ensayo de Luciferasa.....	39
7.3 Citometría de Flujo.....	40

RESULTADOS

1. Clonación de AFP Unida a una Proteína Verde Fluorescente (GFP).....	41
2. Expresión y Purificación de AFP.....	44
3. Proliferación Celular.....	47
4. Efecto de AFP sobre la Actividad Transcripcional del RE.....	51
5. Interacción de AFP con su Receptor (Análisis de Citometría de Flujo).....	54

DISCUSIÓN	58
------------------------	----

CONCLUSIONES	62
---------------------------	----

BIBLIOGRAFÍA	63
---------------------------	----

ABREVIATURAS

AF-1 = Dominio de Activación 1

AF-2 = Dominio de Activación 2

AFP= Alfa fetoproteína

Ca= Cáncer

DBD= Dominio de Unión a DNA

E2= 17 β -Estradiol

LDB= Dominio de Unión a Ligando

ERE= Elemento de Respuesta a Estrógenos

EGFR= Receptor del Factor de Crecimiento Epidermal

ENG= Efectos no Genómicos

ERK= Cinasa reguladora de señales extracelulares (del ingles Extracellular Signal-Regulated Kinase)

GFP= Proteína Verde Fluorescente

GPR30= Receptor de Estrógenos Anclado a la Membrana MAPK= Mitogen Activated Protein

GRE= Dominio de Unión a Glucocorticoides

Kinases (en español MAP cinasa)

MGF= Forma Globular Relajada

NCCN= National Comprehensive Cancer Network (www.nccn.org)

PKB= Proteína Cinasa B

PKC= Proteína Cinasa C

RP=Receptor Progesterona

RA= Receptor de Andrógenos

RE= Receptor de Estrógenos

RG= Receptor de Glucocorticoides

RH= Receptor Huérfano

RM= Receptor de Mineralcorticoides

RN= Receptor Nuclear

RT= Receptor de Hormona Tiroidea

RTK= Receptor Tirosin-Cinasa

RXR= Receptor X de Acido Retinoico

SERM= Modulador Selectivo del Receptor de Estrógenos

SFB= Suero Fetal Bovino

TNF= Factor de Necrosis Tumoral

INDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Estructura de receptores de estrógenos alfa y beta (Kumar R, y cols., 2003).
- Figura 2.** Activación del receptor de estrógenos:
- Figura 3.** Vía de señalización del RE (ER α /ER del ingles estrogen receptor) (Jordan VC. 2001).
- Figura 4.** Estructura molecular de la familia de AFP.
- Figura 5.** Forma desnaturalizada de AFP.
- Figura 6.** Sistema GATEWAY (Invitrogen).
- Figura 7.** PCR plásmido pBlue AFP. Se corrieron productos de PCR.
- Figura 8.** Minipreparación de DNA plasmídico obtenido de la ligación de AFP en pENTR (Gateway).
- Figura 9.** Comprobación de la orientación correcta de la secuencia para AFP en el vector.
- Figura 10.** Comprobación de los insertos a través de PCR.
- Figura 10.** Comprobación de los insertos a través de PCR.
- Figura 11.** Digestión de las construcciones GFP-AFP y psAFP-GFP.
- Figura 12.** Transfecciones con las construcciones GFP-AFP y psAFP-GFP en células COS-7.
- Figura 13.** Western Blot de las proteínas GFP-AFP y AFP-GFP precipitadas con diferentes concentraciones de sulfato de amonio, utilizando un anticuerpo contra AFP.
- Figura 15.** Estandarización del ensayo de proliferación celular a través del método de MTT.
- Figura 16.** Proliferación de células MCF-7.
- Figura 17.** Proliferación de células MCF-7 (2).
- Figura 18.** Actividad transcripcional del receptor de estrógenos en presencia y ausencia de GFP-AFP o AFP-GFP en células MCF-7.
- Figura 19.** Actividad transcripcional del receptor de estrógenos en presencia y ausencia de GFP-AFP o AFP-GFP en células HeLa.
- Figura 20.** Visualización por microscopía de fluorescencia de GFP-AFP en células MCF-7.
- Figura 21.** Análisis de citometría de flujo (FACScan) de células MCF-7, LNCaP y HepG2 incubadas con GFP-AFP.
- Figura 22.** Citometría de células MCF-7 incubadas con GFP-.AFP en presencia y ausencia de una preincubación con E2 100 nM.

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Preparación de porcentajes de Sulfato de Amonio.

Tabla 2. Líneas Celulares

RESUMEN

La alfa-fetoproteína (AFP) es una glicoproteína fetal, de la familia de la albúmina, de 590 aminoácidos, 66 kDa. Durante muchos años, la AFP ha sido utilizada como un marcador sérico para carcinoma hepatocelular y como marcador de defectos en el desarrollo fetal. Sin embargo, recientemente se ha encontrado que esta proteína puede ser oncorreguladora en diversas líneas celulares de cáncer.

Reportes recientes indican que la actividad regulatoria dentro de la proteína completa está localizada en un péptido de 8 aminoácidos en la región carboxilo de la AFP humana nativa. Adicionalmente, se sabe que esta actividad, en células de cáncer de mama, está restringida a células que contienen receptores de estrógenos (RE). De igual forma, AFP y los péptidos derivados de su sitio activo han mostrado ser antiestrogénicos, es decir capaces de bloquear el crecimiento estimulado por estrógenos en tejidos normales y líneas celulares derivadas de tumores, así como en injertos tumorales. Aunque el mecanismo mediante el cual AFP ejerce estos efectos no ha sido identificado, existen datos indirectos que suponen la presencia de un receptor membranal para AFP en las líneas celulares MCF-7, HepG2, linfocitos T y mioblastos (Dudich y cols., 1998).

Como primera etapa para crear una herramienta para estudiar y eventualmente clonar al receptor de AFP, se clonó el gen de AFP unido al gen de la proteína verde fluorescente (GFP) tanto por su lado amino (GFP-AFP) como por su lado carboxilo (AFP-GFP). Esta última construcción puede ser exportada al exterior de la célula por la presencia de un péptido señal. Ambas construcciones fueron secuenciadas para asegurar su correcto diseño. Las proteínas se expresaron en células COS-7. Se extrajo la proteína, tanto citoplasmática como extracelular para recuperar la AFP unida a GFP y se purificó parcialmente utilizando diferentes concentraciones de sulfato de amonio a 4°C y se realizó un western blot para determinar la fracción que contiene la proteína. Posteriormente, se caracterizó la proteína de fusión y se determinó el efecto biológico sobre la proliferación de células MCF-7, las cuales se conoce presentan un receptor específico para AFP. Es conocido que la AFP requiere ser activada mediante un cambio conformacional, inducido por un ligando, y esto facilita la interacción con su receptor. Adicionalmente, se sabe que el estradiol, aunque tiene baja afinidad por la AFP humana, en concentraciones altas permite el cambio conformacional en AFP necesario para su activación. Para determinar que las proteínas de fusión tuvieran la actividad previamente establecida para la AFP silvestre, se realizaron experimentos de proliferación y de transactivación del RE. Los resultados indican que ambas proteínas de fusión, GFP-AFP y AFP-GFP, disminuyen la proliferación celular de células MCF-7, solo cuando están pre incubadas con altas concentraciones de estradiol, sin embargo en ausencia de una pre incubación con estradiol no se lleva a cabo su efecto antiproliferativo. Adicionalmente, se determinó si la GFP-AFP y la AFP-GFP afectan la actividad transcripcional del receptor de estrógenos en presencia y ausencia de estradiol en la línea celular HeLa, derivada de cáncer de cérvix y en la línea MCF-7 la cual se conoce presenta un receptor específico para AFP. El resultado indicó que la actividad transcripcional fue fuertemente afectada en la línea celular MCF-7, que presenta un receptor específico para AFP, mientras que en la línea celular HeLa no fue afectada la actividad transcripcional mediada por un RE transfectado. Finalmente, se demostró por citometría de flujo que en la línea celular MCF-7, la GFP-AFP es capaz de ser internalizada en estas células, mientras que en las líneas celulares LNCaP y COS-7 no se internaliza esta proteína, por lo que estas líneas celulares son buenos candidatos para la clonación del receptor AFP, lo que resultaría de gran interés para comprender como AFP lleva cabo su actividad antiproliferativa.

ABSTRACT

Alpha-fetoprotein (AFP) is a fetal glycoprotein member of the albumin family. For many years, AFP was used as a serum marker for hepatocellular carcinoma and as a marker for fetal developmental defects. However, recently it has been found that this protein can be oncoregulatory in various cancer cell lines. Recent reports indicate that the regulatory activity within the whole protein is localized in an 8 amino acid peptide of at the carboxyl terminus of the native human AFP. Additionally, it is known that this activity in breast cancer cells is restricted to cells which contain estrogen receptors (ERs). Similarly, the AFP-derived peptides and their active site have been shown to be antiestrotrophic, that is, capable of blocking estrogen stimulated growth in normal tissues and tumor-derived cell lines and in tumor xenografts. Although the mechanisms by which AFP exerts these effects has not been identified, there are indirect data involving the presence of a membrane for AFP receptor in various cell lines such as MCF-7, HepG2, T cells and myoblasts (Dudich et al., 1998). As a first step to create a tool to study and eventually clone the AFP receptor, we cloned the AFP gene fused to the gene of the green fluorescent protein (GFP) on its amino (GFP-AFP) and its carboxyl side (AFP-GFP). This latter construction can be exported to outside the cell by the presence of a signal peptide. Both constructs were sequenced to ensure proper design. The fusion proteins were expressed in COS-7 cells. Protein was extracted from both the cytoplasmic and extracellular media and each of the AFP fusion proteins were partially purified using different concentrations of ammonium sulfate at 4 °C. Western blots showed that the 80% ammonium sulfate fraction contained the protein. Subsequently, the fusion proteins were characterized to determine whether they were able to mimic the biological effect of the wild type protein in terms of inhibiting estrogen induced proliferation and estrogen receptor transcriptional activity in MCF-7 cells which have been previously shown to express the putative AFP receptor. It is known that AFP needs to be activated through a conformational change induced by a ligand, and this facilitates interaction with its receptor. In addition, it is known that although estradiol has low affinity for human AFP, in high concentrations it is able to evoke the conformational change in AFP necessary for activation. Proliferation experiments showed that both fusion proteins, GFP-AFP and AFP-GFP, reduce cell proliferation of MCF-7 cells, only when pre-incubated with high concentrations of estradiol, however in the absence of this pre-incubation precludes this antiproliferative effect. Additionally, we determined that both AFP-AFP and GFP-AFP decrease the transcriptional activity of estrogen receptor in the presence of estradiol in MCF-7 cells, however they had no effect on this activity in the HeLa cell line, suggesting that this cell line does not express the AFP receptor. Finally, using flow cytometry, we demonstrated that GFP-AFP is internalized into MCF-7 cells, while human prostate cancer LNCaP cells and COS-7 from green monkey kidney do not internalize this protein, suggesting that these cell lines do not express the AFP receptor. Thus we have found that our fusion proteins has the same biological activity as the native human protein and we have detected cell lines that do not express the putative AFP receptor and are thus good candidates to be used as null background cells for the cloning of this receptor. The future cloning of the AFP receptor will be crucial to the understanding of how AFP realizes its antiproliferative and antiestrotrophic activity in ER positive breast cancer cells.

ANTECEDENTES

1 ESTRÓGENOS

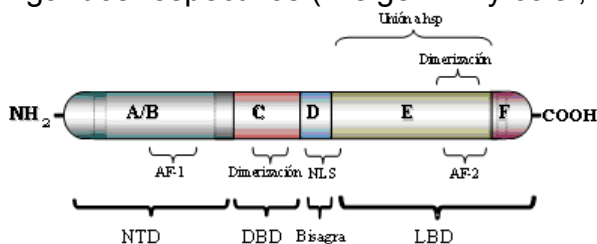
1.1 FUNCIÓN DE LOS ESTRÓGENOS

Los estrógenos pertenecen a la familia de hormonas esteroides, las cuales ejercen una gran variedad de efectos sobre el crecimiento, desarrollo y diferenciación de diferentes tejidos. La acción reguladora primaria de los estrógenos está restringida principalmente a los órganos reproductivos; sin embargo, pueden regular otros procesos en tejidos como hueso, hígado, sistema cardiovascular y cerebro (Katzenellenbogen BS. y cols., 2000). El mecanismo de acción de este esteroide se lleva a cabo a través de su unión a un factor de transcripción específico localizado en el citoplasma y núcleo celular denominado receptor de estrógenos (RE) (Couse JF, y cols., 1999) el cual regula la actividad de genes blanco para esta hormona. Las hormonas en fluidos corporales se encuentran en concentraciones relativamente bajas (del orden de los picogramos o nanogramos), por lo que el receptor debe tener gran afinidad por su hormona. Puesto que el número de receptores es finito, su población en una célula y tejido blanco es saturable. Las hormonas esteroides, como el estradiol, la progesterona, la testosterona y los glucocorticoides, son moléculas liposolubles con una estructura básica de ciclopentano-perhidrofenantreno característica del colesterol. Estas hormonas son liposolubles y tienen acceso directo al interior de la célula, atravesando la membrana plasmática alcanzando el núcleo celular. La subfamilia de receptores de hormonas esteroides está constituida de: receptores para andrógenos (RA), estrógenos (RE), progestágenos (RP), glucocorticoides (RG) y mineralocorticoides (RM). Son miembros de la superfamilia de Receptores Nucleares que también incluye a los receptores de hormonas tiroideas (RT), de ácido retinoico (RXR y RAR) y receptores huérfanos (RH) (Egea PF. y cols., 2000; Heinlein CA, 2002), entre otros.

1.2 RECEPTOR DE ESTRÓGENOS

El receptor de estrógenos pertenece a una superfamilia de receptores nucleares (RN), los cuales son factores de transcripción que regulan la expresión génica de manera dependiente de su unión a ligando y en respuesta específica a señales fisiológicas y patológicas. Estas proteínas poseen unidades estructurales y funcionales bien definidas (Aranda A. y cols., 2001; Krishnan V. y cols., 2001). Actualmente se han identificado dos receptores de estrógenos conocidos como RE α y RE β , formados por una sola cadena de 565 y 530 aminoácidos, respectivamente (Kuiper GG. y cols., 1996) (Figura 1). Existe un tercero y nuevo receptor de estrógenos transmembranal acoplado a proteínas-G conocido como GPR30 o GPER, que actúa de manera independiente de RE α y RE β , pero influye en la activación del factor de crecimiento epidermal (EGF) y activa la vía de transducción de señales de PI3K/Akt, pudiendo así participar en la biología de diferentes cánceres como el de mama (Filardo EJ. Graeber CT. y cols., 2006; Prossnitz ER. y Barton M., 2011), que será tratado mas adelante en esta revisión. RE α y RE β son codificados por diferentes genes y su expresión varía dependiendo del tipo de tejido. RE α es expresado predominantemente en órganos reproductivos (útero, mama y ovario), así como en el hígado y en el sistema nervioso central, en tanto que la forma β es expresada mayoritariamente en otros tejidos como hueso, endotelio, pulmones, tracto urogenital, ovario, sistema nervioso central y próstata (Nilsson S. y cols., 2001; Anderson E. y cols., 2002; Palmieri C. y cols., 2002).

Estos receptores, están conformados por seis dominios denotados de la A a la F (Figura 1), codificados por 8-9 exones (Kuiper GG. 1998) (Fig. 1). Ambos tienen un dominio central de unión al DNA (DBD) muy conservado que mediante dos “dedos de zinc”, se une a secuencias específicas en el promotor o a los sitios “enhancer” de genes regulados por estrógenos (Klinge CM. y cols., 2001). La región carboxilo-terminal del receptor constituye el dominio de unión a ligando (LBD) el cual reconoce a los estrógenos naturales como 17β-estradiol (E2) y a ligandos sintéticos que pueden ser antagonistas totales o SERMs (Moduladores Selectivos del RE), que pueden activar o inhibir al receptor dependiendo del contexto celular y del promotor. Adicionalmente, el LBD contiene una región de localización nuclear, regiones de homodimerización y un dominio de transactivación denominado AF-2, el cual es dependiente de ligando. La interacción con E2 activa al receptor promoviendo una serie de cambios conformacionales que incluyen dimerización, lo que permite que la región AF-2 promueva su interacción con coactivadores transcripcionales (Klinge CM. y cols., 2000). Entre el DBD y el LBD existe una región variable denominada bisagra. La región amino-terminal es la más variable entre los miembros de la familia, tanto en tamaño como en secuencia de aminoácidos, y contiene una región de transactivación denominada AF-1, la cual es ligando-independiente. Las regiones AF-1 y AF-2 pueden activar la transcripción de manera independiente o sinérgica dependiendo del contexto celular y del promotor (Tzukerman MT. y cols., 1994). Por último, en la región N-terminal existen diversos sitios de fosforilación, los cuales son regulados por una variedad de proteínas cinasas (Kumar R. y cols., 2003). El papel que tiene la fosforilación en la actividad de los receptores nucleares no está completamente definido, pero probablemente está involucrado en la modulación de la actividad de AF-1 y su interacción con corre reguladores, así como en la intercomunicación con otras vías de transducción de señales. Adicionalmente, se ha visto que la fosforilación del RE puede relacionarse con su unión a sus elementos de respuesta a estrógenos (ERE). Todos los receptores de esteroides, incluyendo el REα (Denton RR y cols., 1992), son fosforilados después de la unión a sus ligandos respectivos (Weigel NL. y cols., 1998)



Los receptores nucleares están constituidos por tres dominios:

- Dominio amino terminal
- Dominio de unión a DNA (DBD)
- Dominio de unión a ligando (LBD)

Figura 1. Estructura de receptores de estrógenos Alfa.

1.3 REGULACIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN GÉNICA MEDIADA POR EL RE.

El RE activado por ligando, se dimeriza y se une a secuencias específicas sobre promotores blanco, denominadas ERE. La mínima secuencia consenso ERE, es una repetición

palindrómica invertida (IR): 5'AGGTCAnnnTGACCT-3', donde n es cualquier nucleótido (Klein-Hitpass L. y cols., 1998), y se diferencia en sólo 2 pb de los GRE (elementos de respuesta a glucocorticoides) (Klock G. y cols., 1987). La secuencia palindrómica de los ERE tiene un tamaño aproximado de 17 pb, ya que las secuencias flanqueantes son importantes para determinar la afinidad con la cual RE se une a éstas. La mayoría de los genes que responden a estrógenos presentan secuencias imperfectas no palindrómicas (Driscoll MD. y cols., 1998). Se han localizado EREs funcionales en promotores de genes humanos como pS2 (Jeltsch JM. y cols., 1987), oxitocina (Richard S. y cols., 1990), c-fos (Weisz A. y cols., 1990), c-myc (Weisz A. y cols., 1988), TGF- α (El-Ashry D, Chrysogelos SA y cols., 1996), lactoferrina (Teng CT. y cols., 1992), prolactina (Berwaer M. y cols., 1994), PR (Kraus WL. y cols., 1994), catepsina D (Augereau P. y cols., 1994), y complemento 3 (Norris JD. y cols., 1996). El RE α , al unirse a ERE provoca una curvatura del DNA sobre el surco mayor (Berwaer M. y cols Kim J. y cols., 1997). Esta conformación del DNA, facilita las interacciones entre los componentes del complejo de transcripción basal y el promotor del gen blanco, también permite la entrada de otras proteínas, incluyendo a correguladores, que pueden estabilizar estas interacciones y promover la iniciación de la transcripción. Una vez que el complejo de iniciación está completo, la RNA polimerasa II es reclutada y activada, y se inicia la transcripción (Klinge CM. y cols., 2000).

1.4 MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS ESTRÓGENOS

Actualmente se reconocen cinco mecanismos mediante los cuales el receptor de estrógenos regula el crecimiento y proliferación celular (Hall JM. y cols., 2001):

I. Mecanismo clásico de activación dependiente de ligando: La unión de ligando activa al RE induciendo interacción con el DNA y activación transcripcional de genes blanco.

II. Activación independiente de ligando: Varias cinasas de las redes de señalización de factores de crecimiento logran activar al RE y sus proteínas correguladoras en ausencia de ligando.

III. Activación independiente de la unión del complejo hormona-receptor a su elemento de respuesta específico sobre el DNA. El RE unido a su ligando puede activar promotores mediante su unión a otros factores de transcripción, como AP-1, utilizando los sitios de unión a DNA de éstos.

IV. Señalización no-genómica (RE de membrana): Activación de otras cascadas de transducción de señales por medio de un receptor estrógeno-regulado anclado a la membrana (GPR30).

V. Acciones no genómicas del RE α .

Los mecanismos de acción de los estrógenos son clasificados en dos principales mecanismos:

1.4.1 Mecanismo Clásico: El receptor de estrógenos se encuentra en el núcleo o en el citoplasma de la célula. En ausencia de ligando está secuestrado en un complejo con proteínas de choque térmico Hsp90 y Hsp70. Cuando se une la molécula de estrógeno, el receptor de estrógenos es activado, disociándose de las proteínas de choque térmico llevando a un cambio conformacional que le permite la homodimerización y su unión a elementos de respuesta específicos (ERE). Una vez sobre el promotor, los REs reclutan un gran número de proteínas necesarias para iniciar la transcripción. La unión del receptor al DNA recluta factores generales de transcripción, remodeladores de la cromatina y a la RNA polimerasa (RNA pol II) tanto en unión directa o a través de proteínas intermediarias llamadas coactivadores (Figura 2) (Halachmi S. y cols., 1994; Kumar R. y cols., 2003; McKenna NJ. y cols., 2002; Rosenfeld MG. y cols., 2001). El complejo RE-coactivadores estabiliza la formación del complejo proteínico de la transcripción y regula el acceso al promotor (figura 3). La transcripción de muchos genes es incrementada por estradiol, mientras la transcripción de otros es inhibida (Fragor J. y cols., 2002). En general, los genes que son regulados positivamente están involucrados en la regulación de la proliferación, la progresión del ciclo celular, la inhibición de la apoptosis, la estimulación de la invasión (metástasis), y la promoción de la angiogénesis; mientras las proteínas inhibidas tienden a ser reguladores antiproliferativos o productos de genes proapoptóticos.

1.4.2 Activación Independiente de EREs: De manera alternativa, la activación del RE puede ocurrir sobre elementos de respuesta heterólogos por medio de su interacción con otros factores asociados a elementos de respuesta alternativos, como ocurre con AP-1 en los promotores de ovoalbúmina (Halachmi S. y cols., 1994), colagenasa 10 e IGF-1 (Harper MJ. y cols., 1966). Adicionalmente, el RE puede aumentar la transcripción mediada por SP-1 en sitios ricos en GC del promotor del E2F e interviene en la activación de varios genes como son: Myc, TGF beta 3 y receptor de ácido retinoico, entre otros, mediante mecanismos aún no identificados (Bramlett KS. y cols., 2001; Burakov D. y cols., 2002; Gustafsson JA. y cols., 2000). La activación de la transcripción por RE en sitios alternativos es considerada como un factor muy relevante en el mecanismo de acción de RE. Por ejemplo, el SERM “modulador selectivo del receptor de estrógenos” (del inglés selective ER modulators) tamoxifén (TAM), puede actuar como antiestrógeno en EREs y como un ligando agonista en sitios AP-1, dependiendo del contexto celular y del promotor (Fuqua SA. y cols., 2000), se ampliara mas a detalle su función biológica y los alcances en la clínica durante los siguientes capítulos. Además y aunque es menos conocida la actividad del RE β , este tiene algunas funciones distintas de las del RE α y puede tener efectos opuestos en la proliferación de tumores (Gustafsson JA. y cols., 2000; Cause JF. y cols., 2000). En ambos casos, la regulación transcripcional específica celular mediada por el RE es modulada por el reclutamiento de coactivadores, que incrementan la transcripción o corepresores que afectan negativamente la expresión de genes blanco.

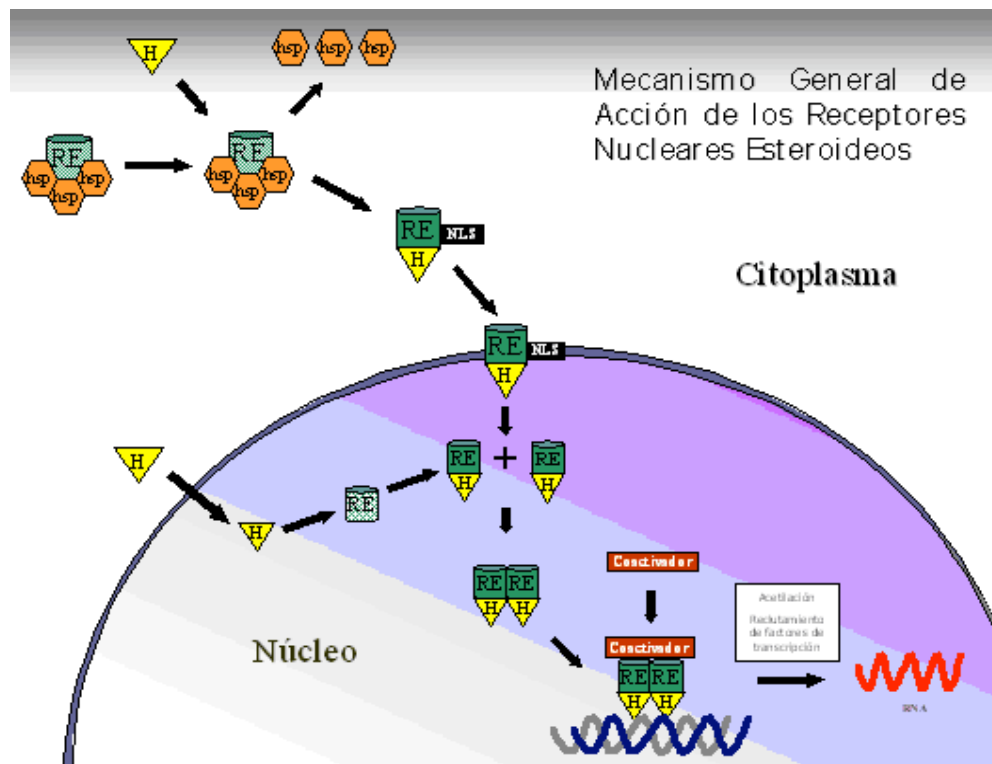


Figura 2. Activación del receptor de estrógenos: Al unirse el receptor con estradiol, se desprende de las proteínas de choque térmico, hsp90 y hsp70. Cambia su conformación, expone la señal de localización nuclear (NLS) y se dimeriza. El receptor se une a los elementos de respuesta al estrógeno (ERE) en el promotor y recluta complejos proteicos necesarios para iniciar la transcripción.

1.5 EFECTOS NO GENÓMICOS (ENG) DE LOS ESTRÓGENOS

En contraste con los efectos genómicos de los estrógenos, a los que ya se hizo referencia y que están mediados por un RE α o RE β nuclear, se han descubierto efectos adicionales de los estrógenos y recientemente se han examinado acciones de los estrógenos que se ejecutan en segundos. En estos casos se ha determinado que no tiene lugar la estimulación de la expresión génica, por lo que a este tipo de respuestas se les ha denominado “efectos no genómicos” de los estrógenos, observados en diferentes tipos celulares (Font de Mora J. y cols., 2000). El uso de inhibidores de la transcripción del ADN o de la traducción como la actinomicina o la cicloheximida, no son eficientes para inhibir las acciones estrogénicas de tipo no genómico. Por el contrario, se ha demostrado que intervienen en procesos como el reclutamiento de señales de localización de la membrana celular, que incluyen a los segundos mensajeros AMP cíclico, calcio y óxido nítrico, así como la activación de cinasas como la tirosin cinasa, proteína cinasa A (PKA), proteína cinasa C (PKC), ERK (*extracellular signal-regulated kinase*) y la proteína cinasa B (PKB/Akt), entre otras.

Desde hace algunos años se ha reportado que las hormonas esteroideas pueden tener una acción celular rápida que no involucra mecanismos transcripcionales (Cowley SM y cols., 1999; Cui Y. y cols., 2004). Se identificaron sitios de unión para estrógenos en la membrana de células endometriales que dirigen la inducción de AMP cíclico (Cullen R. y cols., 2004). Una localización celular precisa de estos REs y el mecanismo por el que ellos señalizan es aun controversial, sin embargo, muchos estudios usando una variedad de técnicas incluyendo microscopia confocal, sugieren la existencia de un pequeño pool de REs localizados en la

membrana plasmática y el citoplasma (Delage-Mourroux R. y cols., 2000; Dotzlaw H. y cols., 2002). La actividades de señalamiento esteroideo iniciadas en membrana “MISS” (del inglés, membrane-initiated steroid signaling) del RE resulta en la activación del receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFR, del inglés Epidermal growth factor receptor), activando la vía de las cinasas con actividad mitogénica MAPK (del inglés, mitogen-activated protein kinases o del español MAP cinasa) fosfatil inositol 3 cinasa y la Akt (proteín cinasa B), enzimas de señalización y adaptadores tales como adenil ciclasa y Shc 40. Recientemente se identificó un receptor de membrana conocido como GPR30 (G-protein coupled Estrogen Receptor), también llamado GPER que estimula la actividad de segundos mensajeros característicos de receptores que presentan siete dominios transmembranales, que abarca a los receptores (7TMRs), y los cuales activan calcio intracelular (Shou J. y cols., 2004), además del AMP cíclico (Cullen R. y cols., 2004) y el inositol trifosfato (Bouras T. y cols., 2001; Filardo E, y cols 2007), que activa una metaloproteasa que libera un factor de crecimiento epidermal unido a heparina de la superficie celular, que se une a EGFR de forma paracrina o autocrina para activar al receptor y su vía de señalización río abajo. Así, el efecto del RE de membrana puede estar influenciando la vía de señalización del EGFR que se observa de forma más evidente en cánceres de mama que sobreexpresan EGFR y HER-2/neu (Bunone D. y cols., 1996; Bourguet W, y cols., 2000; Bramlett G, y cols., 2002). GPR30 actúa independientemente de RE α y RE β , y dirige la acción de EGFR de forma dependiente de estrógenos. En este sentido GPR30 puede desempeñar un papel importante en la biología del cáncer de mama. Adicionalmente, algunos SERMS como el tamoxifén, activan al RE de membrana de manera similar a los estrógenos. Así, la estimulación del RE por tamoxifén y otros SERMs puede, en parte, explicar la resistencia a estos agentes observados en tumores que sobreexpresan HER-2/neu (se abordará este hecho ampliamente en los siguientes capítulos) (Bunone G. y cols., 1996; Frasor J. cols., 2003). Además, los efectos no genómicos (ENG) de los estrógenos han sido intensamente investigados y parecen estar involucrados en una gran cantidad de efectos fisiológicos que incluyen prácticamente todo el organismo. Se han realizado numerosos estudios para probar la existencia de receptores de estrógenos (RE) nucleares con localización en el citosol, que pudieran asociarse con la aparición de los ENG; así, algunos resultados señalan que, luego de la activación del RE α , se produce un incremento drástico en la producción de óxido nítrico a nivel endotelial por aumento de actividad de la oxido nítrico sintetasa (ONS). Otros datos experimentales sugieren que tanto el RE α como el RE β se relacionan con la activación del sistema enzimático ONS, así como de otras rutas enzimáticas, pero los efectos desencadenados dependerían de cada tejido particular, con activación de diferentes cascadas de señalización en los distintos tejidos.

1.6 INTERCOMUNICACIÓN DEL RE CON OTRAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN

La intercomunicación (cross-talk) descrita entre el RE y algunas vías de transducción de señales puede contribuir a adquirir resistencia endocrina en células tumorales sensibilizadas por antiestrógenos. Varios factores de crecimiento pueden estimular la actividad del RE en ausencia de su ligando, incluyendo EGF y la proteína cinasa A (PKA) (Bunone G. y cols., 1996; Smith CL. y cols., 1998).

Como se mencionó anteriormente, se ha demostrado que los RE membranales puede activar la señalización de HER-2/neu, a través de una cascada de cinasas río abajo de HER-2/neu y sus proteínas reguladoras pueden, a su vez, fosforilar y activar al RE (Figura 3) (Shou J. y

cols., 2004). Además el RE es activado por una variedad de cinasas en la vía del HER-2/neu incluyendo ERK 1/2 y p38, MAPKs, ciclina-dependiente de cinasa 2, ciclina dependiente de cinasa 7, c-Src, PKA, pp90rsk1 y Akt (Fuqua SA. y cols., 2004). La fosforilación de algunos de estos sitios específicos incrementa la actividad transcripcional del RE aun cuando esta unido a tamoxifén, jugando así un papel de importancia en la resistencia a terapia endocrina (Shou J. y cols., 2004; Ali S. y cols., 1993). Como se muestra en la figura 3, la fosforilación de coactivadores y corepresores del RE también es importante. La fosforilación del corepresor N-CoR causa la salida de la proteína del núcleo haciéndola no disponible para reprimir la actividad transcripcional de RE (Girault I. y cols., 2003). La fosforilación de coactivadores tales como AIB1 (SRC3) incrementa la transcripción dependiente de RE (Shou J. y cols., 2004; Ali S. y cols., 1993; Hong SH. y cols., 2000).

Evidencias clínicas y experimentales sugieren que la expresión incrementada de EGFR y HER-2/neu es asociada a una respuesta disminuida al tratamiento con tamoxifén (Shou J. y cols., 2004; Mass R. y cols., 2000; Nicholson RI. y cols., 2002). HER-2/neu es sobreexpresado en 20-30% de los cánceres de mama y esta asociado con una incrementada tumorigenicidad y resistencia a terapia endocrina (Wright C. y cols., 1992). Además, datos de modelos experimentales sugieren que la resistencia a terapia a través de la privación de estrógenos, tales como el tratamiento con inhibidores de aromatasas ocurre a través de una adaptación a un fenotipo hipersensitivo a estrógenos que puede involucrar la activación de ERK 1/2 y la vía MAPK (Masamura S. y cols., 1995). Se ha encontrado que ERK1/2 están incrementadas en líneas celulares de cáncer de mama resistentes a estrógenos y en pacientes, y esto correlaciona con una pobre calidad de vida y corta respuesta a terapia endocrina, así como decremento de la sobrevivencia (Gee JM. y cols., 2001; Martin LA. y cols., 2005; Shim WS. y cols., 2000). Esto sugiere un importante papel para la actividad de ERK1/2 en resistencia endocrina. Inicialmente, se podría esperar que los inhibidores de aromatasas sean más eficientes que el tamoxifén en tumores que sobreexpresan receptores de factor de crecimiento, además los inhibidores de aromatasas reducen la concentración de ligandos tanto de RE nucleares como membranales, mientras que tamoxifén podría activar a los receptores de membrana. Varios estudios clínicos ahora sustentan esta idea y se tiene demostrada una superioridad de los inhibidores de aromatasas sobre el tamoxifén en estos estudios. (Smith I. y cols., 2003; Zhu L. y cols., 2004).

Evidencias clínicas adicionales apoyan el papel del "cross-talk" de diferentes vías de señalización. Así, en un estudio reciente donde pacientes cuyos tumores expresaron altos niveles del receptor de membrana HER-2/neu y el coactivador de RE AIB1, mostraron resistencia al tratamiento hormonal, después de haber recibido tamoxifén como tratamiento para la enfermedad. Lo que se concluyó en este estudio fue que las células tumorales pudiesen encontrar alguna vía alterna para impedir el efecto del tamoxifén (Instituto Nacional de Estadística: INE-BASE: Cifras de población al 1 de Enero de 2000: Población Total por Sexo. <http://www.ine.es>).

Por otra parte la vía de señalización fosfatidil inositol 3 cinasa (PI3K) también juega un papel importante en la actividad del RE. La activación de la serina/treonina cinasa, AKT, uno de los blancos río abajo (downstream) de esta vía, está involucrada en la fosforilación de Ser 167 que en ciertos casos resulta en la activación ligando-independiente del RE (Campbell RA. y cols., 2001; Martin MB. y cols., 2000). Los tres miembros de la familia Akt han sido encontrados sobreexpresados en cáncer de mama así como en otros cánceres, usualmente a través de la amplificación de genes (Testa JR. y cols., 2001). Estos datos sugieren que la regulación aberrante de esta vía de señalización puede jugar un papel en el desarrollo de la progresión a la resistencia endócrina del cáncer de mama.

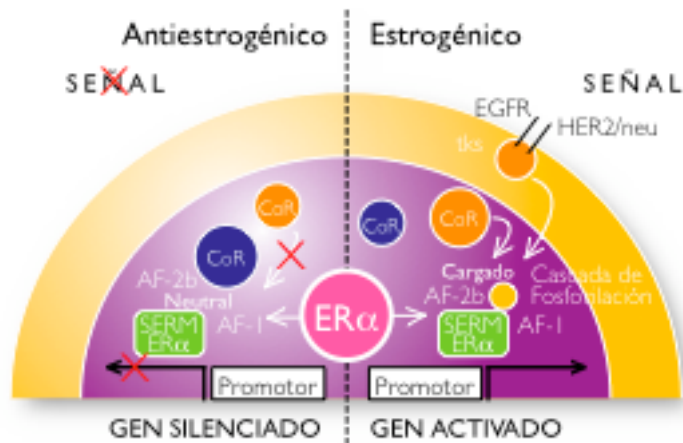


Figura 3. Vía de señalización del RE (ER α /ER del inglés estrogen receptor) (Jordan VC. 2001).

1.7 CÁNCER DE MAMA Y RELACIÓN CON LA REGULACIÓN DEL RECEPTOR DE ESTRÓGENOS

El cáncer de mama es la neoplasia maligna más frecuente en la mujer en nuestro país. Los últimos datos indican que causa el 18.2% de las muertes por cáncer en la mujer y es la primera causa de muerte en mujeres entre los 40 y 55 años. Su incidencia está en aumento sobre todo en los países desarrollados (NCCN, 2007). A pesar de que aumenta la incidencia, la tasa de mortalidad ha disminuido en los últimos años. Estos beneficios se atribuyen a los programas de detección precoz y a los avances en el tratamiento sistémico (Levi F. 2005). Diferentes estudios han examinado los mecanismos de la carcinogénesis de la mama lo que ha originado el estudio de varios factores que pueden incrementar el riesgo para la enfermedad, entre ellos encontramos: Los factores hereditarios, el uso indebido de hormonas sintéticas, la edad avanzada durante el primer parto o abstenerse de embarazarse, así como el abuso de alcohol, tabaco u otras drogas. Así, entre los componentes hereditarios se han identificado los genes llamados BRCA1 y BRCA2, los cuales son responsables de la mayoría de los casos de cáncer de mama inherentes; sin embargo, solo se presentan mutaciones en estos genes en menos del 5% de los casos (Miki Y cols., 1994; Wooster R. y cols., 1994). Adicionalmente, mutaciones en BRCA1/2 también predisponen a mujeres a desarrollar cáncer de ovario, que tiene una alta tasa de mortalidad.

Entre el 40-70% de los cánceres de mama expresan al RE α (Cullen R. y cols., 2001). El descubrimiento de la participación de estrógenos ováricos (el más abundante en circulación es el 17 β -estradiol o E2), en la estimulación del crecimiento de cáncer de mama los ha hecho un blanco importante de un sin número de terapias que inhiben la síntesis de estrógenos o bloquean su receptor. Es claro que en una gran proporción de casos el E2 promueve la progresión de cáncer de mama estimulando la proliferación celular. Esto se apoya en la correlación entre la positividad de RE en tumores de mama y su respuesta a terapia endocrina, lo que indica que los receptores de estrógenos (REs) juegan un papel crítico en la fisiopatología del cáncer de mama

La razón por la cual la exposición prolongada a estrógenos puede incrementar el riesgo de desarrollar cáncer de mama es desconocida. Una posibilidad es que los estrógenos promuevan el desarrollo de cáncer de mama a través de la acción mediada por el RE a través de algunos de sus metabolitos. Hay evidencias en modelos murinos que muestran que

algunos productos hidroxilados de estrógenos (conocidos como catecol-estrógenos) pueden ser convertidos en quinonas que pueden causar alteraciones en el DNA (Cavailieri y cols., 1997). Estrógenos no esteroideos como el dietilestilbestrol, también pueden ser carcinogénicos, probablemente a través de su conversión a catecol-quinonas que pueden causar daños al DNA. Sin embargo, no hay evidencias de porqué la acción de estos carcinógenos podría ser restringida solo a cánceres de mama o de útero, aunque una posibilidad se deba a que estos tejidos tienen altos niveles de enzimas metabolizantes de estrógenos (Safe SH. y cols., 1998; Clemons M. y cols., 1998).

La expresión de REa es factor de buen pronóstico en pacientes de cáncer de mama; sin embargo, el valor pronóstico del REb aun no se ha definido. Recientemente, se ha reportado que ERb y varias de sus isoformas, pueden regular la actividad de REa en cáncer de mama (Fuqua SA. y cols., 1999; Speirs V. y cols., 2000; Witck A. y cols., 2003). Aproximadamente el 70% de los tumores de mama expresan RE, por lo que son candidatos a terapia antihormonal con moduladores selectivos del receptor de estrógenos como el tamoxifén que ya se mencionó anteriormente.

La terapia endocrina constituye parte esencial del tratamiento tanto en el escenario adyuvante como en la enfermedad metastásica y es determinado por la expresión de los receptores de estrógenos (RE) y/o los receptores de progesterona (RP). Al momento se cuenta con dos recursos farmacológicos para reducir el efecto del estrógeno en las células tumorales: la inhibición de la acción del estrógeno con agentes antiestrogénicos y la prevención de la producción de estrógenos por medio de la inhibición de la enzima de la aromatasa. Tamoxifén adyuvante por 5 años es el tratamiento estándar para mujeres premenopáusicas que expresen ER y/o PR. En las mujeres posmenopáusicas los inhibidores de aromatasa con o sin Tamoxifén son el nuevo estándar de manejo adyuvante (Morales Vázquez, 2006). Tamoxifén es un fármaco ampliamente utilizado para tratar todos los estadios de cáncer mamario en pacientes REa positivo, así como para la prevención del cáncer en mujeres con alto riesgo de desarrollar la enfermedad (Fisher B. y cols., 1998) y es uno de los agentes de tratamiento oncológico más seguro, barato, bien tolerado y ante todo efectivo, demostrado por numerosos ensayos clínicos. El tamoxifén tiene efectos antagonistas en la glándula mamaria mientras muestra efectos agonistas en hueso y útero, eliminando así los efectos negativos sobre hueso que tendría un antagonista completo. Sin embargo, un tercio de las pacientes con cáncer de mama REa positivo, y que han respondido a terapia con tamoxifén, desarrollan resistencia después de tratamientos prolongados, permitiendo que los tumores se desarrollen nuevamente y que la enfermedad se vuelva recurrente.

El mecanismo a través del cual se desencadena la resistencia en este tipo de cáncer, aún no se conoce, sin embargo, en la mayoría de los casos no se ha visto asociada con la pérdida de expresión o mutaciones del REa (Dorssers LC. y cols., 2001). Por lo anterior, existe la hipótesis de que el mecanismo de resistencia a tamoxifén, puede deberse a modificaciones en la interacción del ERA con algunas proteínas correguladoras, y/o por activación mediada por diversas vías de transducción de señales que se mencionaron anteriormente.

1.8 RECEPTORES MEMBRANALES BLANCO EN EL TRATAMIENTO CONTRA CÁNCER DE MAMA

Existen diversos mecanismos moleculares a nivel celular que pueden funcionar como oncogénicos. Sin entrar en detalle en ellos, diversos oncogenes codifican para receptores mutados de factores de crecimiento, con actividad tirosina-cinasa cuya activación por ligandos

(conocidos para unos receptores y desconocidos para otros) desencadena la activación de las vías de señalización celular que llevan a la proliferación descontrolada. La mutación más común es la delección del dominio extracelular; en otras ocasiones se observan mutaciones puntuales que confieren la propiedad de estar activados de modo constitutivo. Con menos frecuencia se deleta el extremo carboxilo terminal de dichos receptores y así se elimina una secuencia reguladora negativa de la actividad del receptor. Sin embargo, para el receptor membranal de más relevancia identificado en el cáncer de mama en los últimos años, el mecanismo por el que tiene lugar la oncogénesis es por un aumento de la expresión del receptor no mutado; el subsiguiente incremento de la actividad tirosín-cinasa induce transformación celular. Hablamos de HER-2/neu; se trata de una proteína de membrana que corresponde al receptor tipo 2 (de 4 descritos hasta la actualidad) del factor de crecimiento epidérmico. La amplificación del gen del HER-2/neu se encuentra en un 30 % de los cánceres de mama y se correlaciona con más incidencia de metástasis en los ganglios regionales, grado histológico más agresivo y presencia de estadios más avanzados al diagnóstico. Adicionalmente, se relaciona con resistencia a diversos agentes quimioterapéuticos y hormonales. Los análisis multivariantes apoyan que su expresión ejerce una influencia (negativa) independiente del resto de los factores pronósticos en la supervivencia en pacientes con ganglios positivos respecto a la no expresión. HER-2/neu está codificado por el gen *erbB-2* humano que codifica una proteína de 1255 aminoácidos perteneciente a la familia de los receptores tirosina-cinasa (RTK). Los miembros de esta familia incluyen tanto al EGFR (codificado por el *erbB-1*), como a las proteínas codificadas por los genes *erbB-2*, *erbB-3* y *erbB-4* (Allred DC. y cols., 1986; Allred DC. y cols 1993).

La unión de los ligandos a los receptores con actividad tirosina-cinasa produce, en general, la dimerización del receptor. (Cochet C. y cols., 1988). A continuación se inicia la actividad tirosina-cinasa del receptor, fosforilando sitios tirosina del propio receptor; de esta manera permite la unión estable a las moléculas efectoras que ponen en marcha los caminos de señalización celular. La activación de HER-2 pone en marcha al menos 5 vías de señalización celular independientes la mayoría de las cuales pueden iniciar la activación de genes en el núcleo (Vías del PLC, fosfatidil inositol-3-cinasa, STAT-91, RAS-RAF-MAP y SRC) (Weiner DB. y cols., 1989; Pawson T. y cols., 1993). Mientras que HER-2/neu se expresa a concentraciones bajas en diversas células normales, en varios cánceres se sobreexpresa. En general este hecho está causado por amplificación genética o un incremento del número de genes *erbB-2* en el núcleo. Esta sobreexpresión desempeña un papel en la progresión del tumor, incrementando el crecimiento celular y la transformación oncogénica.

A nivel práctico, la significación del HER-2/neu en el cáncer de mama es múltiple: el cáncer de mama evoluciona desde la lesión premaligna no invasiva (carcinoma *in situ*) hasta el carcinoma metastático, pasando por los estadios localizados.

Es posible encontrar la amplificación del *erbB-2* en todos los estadios del cáncer de mama, pero no se ha encontrado en lesiones benignas de la mama; esto sugiere que el gen no se amplifica antes de un verdadero estado maligno (Allred DC. y cols., 1992). La sobreexpresión se mantiene en lesiones metastásicas, sugiriendo una función continuada del HER-2. (Lacroix H. y cols., 1989).

El grupo de Niehans *et al.* (Niehans GA. y cols., 1993) analizó la expresión de esta oncoproteína en 30 pacientes mediante inmunohistoquímica. De ellos, 18 sobreexpresaban el HER-2/neu en las metástasis, 15 (80%) de los cuales lo sobreexpresaban en todas. Adicionalmente, todos los pacientes con sobreexpresión en tumor primario, mostraban sobreexpresión en las metástasis. De hecho, se ha sugerido que la prevalencia de sobreexpresión del HER-2 en lesiones metastásicas a distancia es mucho mayor del 30% presente en las lesiones localizadas en la mama, sugiriendo una selección positiva de las

clonas celulares que sobre-expresan este factor. Por ejemplo, el trabajo de Braun *et al* (Braun S. y cols., 2001) muestra en médula ósea una prevalencia del 60% de sobreexpresión del HER-2/neu en las micrometástasis del cáncer de mama. Esto abrió la posibilidad al uso del Trastuzumab anticuerpo monoclonal humanizado, desarrollado contra este factor de membrana. Un anticuerpo monoclonal supone un cambio conceptual en el tratamiento de los tumores sólidos, constituyendo la primera terapia dirigida específicamente contra las células tumorales y sin efecto sobre las células normales, con verdadera eficacia clínica. Es frecuente en la práctica clínica observar regresión de todas las lesiones metastásicas al tratar a las pacientes con Trastuzumab, apoyando que la hipótesis de la presencia del HER-2 en todas las metástasis no es sólo un hallazgo de laboratorio, sino que tiene traducción real.

HER-2 no sólo es importante por ser en sí mismo una diana terapéutica. Diversos trabajos sugieren que la amplificación del HER-2/neu está relacionada con la resistencia a tratamientos quimio/hormonales en el cáncer de mama avanzado. El tamoxifén ha sido, hasta hace poco, el tratamiento de elección de primera línea en cáncer de mama metastático en pacientes no jóvenes, sin metástasis viscerales progresivas o con peligro para la vida. Sin embargo, los trabajos de Nabholz *et al.* (Nabholz JM. y cols., 2003), Mouridsen H, *et al.* (Mauridsen H. y cols., 2003) y Paridaens R, *et al.* (Paridaens R. Y cols., 2004) han mostrado una superioridad de los inhibidores de la aromatasa anastrozol, letrozol y exemestano respecto al tamoxifén. Adicionalmente, dos trabajos sugieren que la efectividad del tamoxifén es inferior en las pacientes que sobreexpresan HER-2/neu (Wright C. y cols., 1992; Bianco AR y cols., 1998). Al parecer, los inhibidores de la aromatasa podrían superar esta adversidad, es decir, al producir una privación de estrógenos podrían evadir los mecanismos de resistencia mediados por HER-2/neu (Wong ZW. y cols., 2004).

En lo que respecta a la resistencia a quimioterapéuticos, la mediación de HER-2/neu en pacientes con cáncer de mama localizado es más controvertida: En los primeros estudios acerca del impacto pronóstico de la amplificación del HER-2/neu se sugiere que el pronóstico desfavorable para los pacientes con dicha característica se debe en parte a la resistencia a quimioterapéuticos, en particular al régimen Ciclofosfamida/Metotrexato/Fluorouracilo (CMF). Dichos estudios datan del año 92 (Allred DC. y cols., 1992; Gusterson BA. y cols., 1992). Sin embargo, estudios posteriores no confirmaron diferencias en la respuesta a CMF entre los pacientes con amplificación del gen y los pacientes sin ella.

La ciencia avanza en la investigación de nuevos fármacos que puedan ayudar a combatir esta enfermedad que aqueja a una gran cantidad de mujeres en nuestro país y en el mundo. Así, se ha observado que una nueva clase de agentes con actividad anticancerígena como AFP pueden ser utilizados como agentes terapéuticos en el combate del cáncer de mama.

2 ALFA-FETOPROTEÍNA EN CÁNCER DE MAMA

2.1 GENERALIDADES

La Alfa-fetoproteína (AFP) es una glicoproteína sérica fetal, de la familia de la albúmina, con masa molecular de 68 kDa. Durante muchos años, la AFP ha sido utilizada como un marcador sérico para carcinoma hepatocelular y defectos en el desarrollo fetal. Sin embargo, recientemente se ha encontrado que esta proteína puede ser oncorreguladora en diversas líneas celulares de cáncer. Desde su descubrimiento en 1956, se han reportado un gran número de actividades para la AFP, que incluyen transporte de ácidos grasos poliinsaturados, unión y transporte de varios ligandos tales como bilirrubina, ácidos grasos, esteroides, metales pesados, colorantes, flavonoides, piroestrógenos, dioxinas y varias drogas (Mizejewski

GJ. y cols., 1985, Deutsch HF. y cols.,1991), inmunorregulación, regulación de presión osmótica en fluidos intravasculares y como marcador en la circulación materna para productos fetales con carcinomas hepatocelulares embrionarios y defectos del nacimiento (Tatarinov YS. y cols., 1986, Crandall BF. y cols.,1981; Smalley JR. y cols., 1980; Lazarevich NL. y cols., 2000). Adicionalmente, se ha demostrado que la AFP es capaz de modular el crecimiento regulado por estrógenos en células de cáncer mamario humano (Nathan C, y cols., 1993). Como se mencionó anteriormente, niveles alterados de AFP en suero han sido observados coincidentemente con manifestaciones aberrantes de crecimiento fetal, sin embargo no es la causa de tales cambios. Aunque AFP no es la causa directa de las alteraciones de crecimiento observadas en defectos en el nacimiento y en cáncer, es concebible que algunas formas (variantes) conformacionales de esta proteína, inducidas por el shock/estrés, pueden influenciar o contribuir a tales eventos. En la década pasada, emergieron reportes sugiriendo que algunas de estas formas de AFP pueden servir como reguladores duales del crecimiento, capaces tanto de incrementar como de inhibir el crecimiento (Mizejewski GJ. y cols 1997, Hsourigui M, y cols., 1992). Variantes moleculares de AFP de mamífero han sido reportadas en la literatura científica desde 1970. Inicialmente, algunas de estas variantes fueron atribuidas a la microheterogeneidad de carbohidratos y alteraciones en el punto isoeléctrico (Crandall BF y cols., 1981; Smith CJP. y cols., 1980). Adicional a las isoformas de AFP, están las variantes genéticas y glicofomas de lectinas, que fueron detectadas y aisladas por punto isoeléctrico, electroforesis y cromografía (Beborowica J. y cols1988; Takata K. y cols., 1998). Hasta hoy no existe un catálogo de las múltiples isoformas o variantes conformacionales de AFP en la literatura.

2.2 FAMILIA ESTRUCTURAL

La AFP es clasificada como miembro de la familia de genes albuminoideos, que consiste de cuatro miembros hasta la fecha descritos: albúmina, proteína de unión a vitamina D, AFP, y alfa-ALB también conocida como afemina en humanos (McLeod JF. y cols., 1989; Lichenstein HS. y cols., 1994). Esta familia es estructuralmente caracterizada por residuos de cisteína que forman puentes disulfuro formando horquillas plegadas en capas, resultando en tres dominios adoptando una forma molecular en U (figura 4). Los tres dominios de la familia de genes han sido confirmados por cristalografía de rayos X (Carter DC. y cols., 1990; Luft AJ. y cols 1983). Los miembros de esta familia muestran similitudes estructurales, en términos de secuencia de aminoácidos y puentes disulfuro estabilizados por una bisagra. En humanos los cuatro genes están situados en tandem en el cromosoma 4 en la región 4q11-q22, y están compuestos por 15 exones y 14 intrones (Yang F. y cols 1985). Todos los miembros de esta familia son capaces de transportar ligandos, pero muestran una gran variedad de otras funciones, incluyendo quimiotaxis, secuestro de radicales libres, actividad esterasa, adherencia de leucocitos, peroxidación, unión de actina, metales pesados y ácidos grasos, entre otros (Gutteridge JMC. 26y cols 1986; Constants J. y cols., 1992).

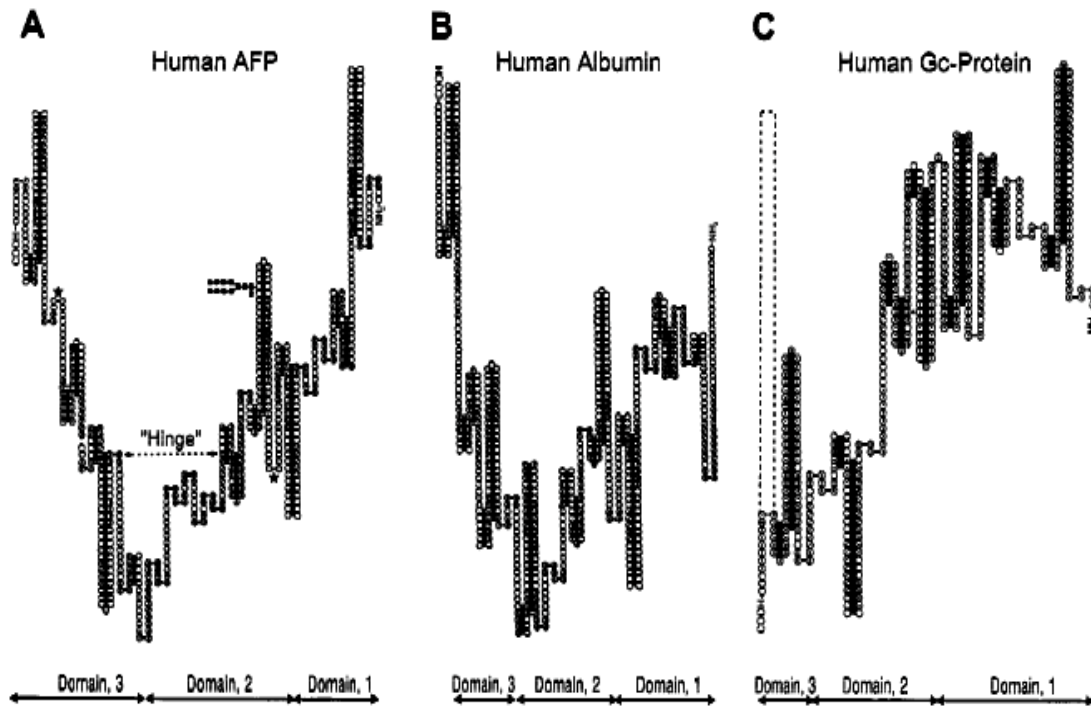


Figura 4. Estructura molecular de la familia de AFP

2.3 VARIANTES GENÉTICAS

Las variantes genéticas de AFP en mamíferos han sido estudiadas primariamente en roedores y han sido menos estudiadas en humanos. Sin embargo, en ratón la expresión de este gen ha sido descrita en gran detalle, incluyendo la expresión fase-específica de RNA mensajero (RNAm) de AFP, y su regulación diferencial durante la vida fetal y la vida adulta, la regeneración de hígado y la tumorigénesis (Andres OK. y cols., 1982; Tamaoki T. y cols., 1984). Aunque todas las variantes de RNAm de AFP han sido traducidas en proteínas in vitro, no todas han sido detectadas in vivo. El principal RNAm de AFP derivado de tumor y fase fetal consiste de un transcrito de 2.2 kb que traduce una forma molecular de 69 a 70 kD en humano y roedor, dependiendo de su contenido de carbohidratos (Petropoulos C. y cols., 1983; Petropoulos C. y cols., 1985). El hígado fetal de rata expresa primariamente un transcrito de 1.7 kb que traduce una proteína de 50 a 65 kD (37Chou JY. y cols., 1986; Lemire JM. y cols 1991). Esta variante representa solo el 40% de la molécula normal de AFP humana traducida del RNAm de 2.2 kb, faltándole el primer dominio completo y una tercera parte del segundo dominio. Esto puede ser de gran interés ya que receptores huérfanos, que dimerizan con otros receptores nucleares, tienen una estructura similar truncada, sin embargo no se ha demostrado que AFP pudiera unirse algún receptor esteroideo (Sarcione EJ. y cols., 1985; Resnick EM, y cols., 2000; Mizejewski GJ. y cols., 1993).

La forma adulta de AFP humana, como la forma de rata, también se puede derivar de múltiples transcritos de RNA de 2.2, 1.7 y 1.6 kb. Se demostró previamente en las revisiones filogenéticas de AFP (Mizejewski GJ. y cols., 1995) que una porción del amino terminal (dominio I) distingue AFP de rata de otras moléculas de mamíferos (AFP humana). Se ha mostrado que el dominio III muestra una gran identidad en secuencia de amino ácidos entre diferentes especies de mamíferos, a diferencia de los dominios I y II. El dominio III también contiene un principal sitio de unión hidrofóbico en humanos y se ha propuesto presenta un dominio de dimerización (Mizejewski GJ. y cols., 1997; Mizejewski GJ. y cols., 1993). Los

dominios I y II contienen sitios de unión a ácidos grasos y bilirrubina; sin embargo el dominio II también muestra secuencias de aminoácidos relacionados a regiones de adherencia a la matriz extracelular y celular por anclaje a carbohidratos vía asparagina (Seal W. 1998; Resnick EM. y cols 2000).

2.4 FORMAS INTERMEDIAS DESNATURALIZADAS MGF (FORMA GLOBULAR RELAJADA)

Las proteínas que residen dentro de las células se creen asumen un estado conformacional diferente al de moléculas secretadas encontradas en circulación y/o almacenados en fluidos biológicos (Bychkova VE. y cols., 1993). El medio ambiente altamente variable de diferentes compartimientos intracelulares, dicta que una proteína exista en una configuración compacta o en un estado desnaturalizado medio (sin plegarse), que ha sido determinado como la forma MGF (forma globular relajada, de sus siglas en ingles: Molten Globular Form). Se sabe actualmente que la MGF ha sido implicada en una variedad de actividades biológicas incluyendo: translocación de proteínas, inserción dentro de membranas, proteínas de choque térmico, unión, reconocimiento y degradación de proteínas por lisosomas o sistemas de ubiquinonas. La MGF representa un estado de plegamiento de una proteína inducida por condiciones desnaturalizantes. En contraste, la exposición a fuertes soluciones iónicas, detergentes y valores extremos de pH, pueden causar su degradación. Este estado relajado ha sido demostrado en muchas proteínas diferentes ocurriendo de manera natural, incluyendo a la AFP (Uversky VN. y cols., 1995; Pattus F. y cols., 1990).

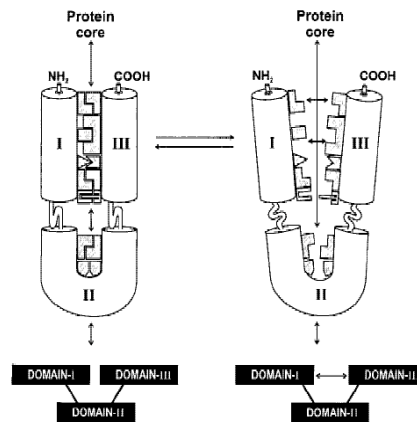


Figura 5. Forma desnaturalizada de AFP

El citoplasma en la célula viva contiene altas concentraciones de proteínas, ácidos nucleicos y organelos a bajo pH (4.5-5.0), que comúnmente se encuentran sometidos a choque osmótico y térmico, a campos eléctricos variables y a una variedad de interfases membranales (Bychkova VE. y cols., 1995). En esta forma más flexible, una proteína puede adaptar su propia configuración rápidamente cambiando ante las condiciones que la célula brinda, interaccionando con proteínas chaperonas de membrana. Se ha sugerido que AFP (como ejemplo de proteína) en su forma intacta o nativa es una molécula compacta y rígida con un centro inaccesible (figura 5), pero cuando es expuesta a microambientes de choque térmico, la molécula de AFP fetal puede progresar a través de una o más formas intermediarias hasta

llegar a la forma transitoria de MGF donde se libera levemente de su empacamiento y se abren las cadenas que la pliegan (Fig. 5). La forma MGF representa una molécula totalmente flexible, accesible a solventes, que además presenta residuos no polares y una completa movilidad tanto de la cadena lateral aromática así como de su cadena lateral alifática. Esta forma flexible de AFP muestra afinidad por la membrana celular (Bychkova VE. y cols., 1993; Van der Groot FG y cols., 1991; Bychkova VE. y cols., 1988; Lorimer GH. y cols., 1996). Estudios de laboratorio han mostrado que la conformación de AFP se modifica seguida de cambios en el microambiente, por ejemplo, un incremento de concentraciones de ligandos hidrofóbicos en suero tales como esteroides y ácidos grasos son capaces de modificar la estructura de AFP (Uversky VN y cols., 1997; Hsourigui M y cols., 1992). Se ha demostrado que en este estado relajado, la AFP humana no se une a E2 en concentraciones bajas (Uversky VN y cols., 1995; Uversky VN. y cols., 1997). Sin embargo, se ha observado que la AFP expuesta a altas concentraciones de E2 puede cambiar su estado conformacional exponiendo epítomos que pudieran favorecer interacciones de AFP con su posible receptor membranal (Mizejewski GJ, cols., 1985; Mizejewski GJ, y cols., 1997; Mizejewski GJ. y cols., 1996; Mizejewski GJ. y cols., 1983).

2.5 AFP COMO ANTICANCERÍGENO

Desde hace muchos años, se han medido niveles de AFP en suero para determinar la existencia de problemas hepáticos. Adicionalmente, existen varios estudios que han apuntado hacia un papel de la AFP en el cáncer de mama. Inicialmente, se estudió el papel de la AFP *in vivo* en mujeres relacionada a factores asociados con el embarazo, como son el estrógeno elevado (Allard D. y cols. 1995) y la AFP circulante. Se han correlacionado los niveles elevados de AFP en suero materno durante el embarazo con un menor riesgo de cáncer de mama (Constants J. y cols. 1992). En este aspecto, dos estudios recientes compararon los niveles de AFP materna durante el embarazo con la incidencia de cáncer de mama, comprobado histológicamente. El primer estudio, en 42,057 mujeres Danesas (Campbell ID. y cols. 1993), mostró que los niveles elevados de AFP durante el embarazo se asocian con un menor riesgo de cáncer (41%) comparado con mujeres que tuvieron niveles más bajos de AFP durante el embarazo. Esta asociación fue aún mayor en mujeres menores de 30 años (Wan YJV. y cols. 1989). Adicionalmente, este estudio indicó que, de las 117 mujeres que desarrollaron cáncer de mama, aquellas con AFP elevada tuvieron mejor pronóstico y una asociación significativa con menor incidencia de tumores grandes (> 2cm).

Adicionalmente, Bennett JA, y cols., 2002, determinaron que la alfa-fetoproteína (AFP) es un potente factor antiestrogénico, mostrando un alto potencial para su uso como una nueva clase de agentes terapéuticos contra cáncer de mama. Reportes recientes indican que esta actividad en la proteína completa está localizada dentro de un péptido de 8 aminoácidos derivado de la AFP humana nativa, considerando a este péptido sintético, como posible blanco terapéutico. La actividad antiestrogénica de la AFP y sus péptidos derivados, se sabe está restringida a células que contienen receptores de estrógenos *in vivo* e *in vitro*. Usando AFP marcada, Villacampa MJ. 1984 y cols., identificaron un posible receptor para AFP en la línea celular MCF-7 de cáncer de mama. Este trabajo claramente indica que AFP es internalizada a través de un receptor, que dicha internalización se incrementa a 37°C, y que no es afectada por transferrina, pero es dependiente de una proteína celular sensible a tripsina (Villacampa MJ. y cols., 1984).

De igual forma, AFP y péptidos derivados de su sitio activo han mostrado ser oncorregulatorios, capaces de bloquear el crecimiento estimulado por estrógenos en

tejidos normales y líneas celulares derivadas de tumores, así como en injertos tumorales. Adicionalmente, Bennet y cols., 2002 demostraron que AFP es capaz de inhibir el crecimiento de líneas celulares cancerosas que son resistentes a tamoxifén mediante un mecanismo que no involucra directamente una competencia por el receptor de estrógenos. Adicionalmente, existen evidencias preliminares que apuntan a que AFP requiere de MAP cinasas y PI3R para llevar a cabo su efecto antiproliferativo (S. Festin, comunicación personal), suponiendo así que AFP es capaz de regular una cascada de transducción de señales que modulan al receptor de estrógenos, mediada por MAP cinasas y PI3R (Lee H. y cols., 2000; Campbell y cols., 2001). En la última década, varios reportes han confirmado que AFP sirve como un regulador dual de crecimiento capaz tanto de incrementar o como de inhibir la proliferación celular (Mizejewski GJ. y cols., 1983; Greenberg F. y cols., 1992; Leffert HI. y cols., 1974). La capacidad de modular tanto a la alta como a la baja el crecimiento y la diferenciación como una función dependiente de la dosis de AFP ha sido demostrada ahora en una multitud de tipos celulares incluyendo: placenta, ovario útero, epidermis linfoide, endotelio testicular, mama e hígado (Toder V y cols., 1983; Jacobson HI y cols., 1990), y ciertos tipos de cánceres (Semenkova LN. y cols., 1997; Bennett JA. y cols., 1998). Sin embargo, la regulación de estos mecanismos no ha sido claramente elucidada.

Se ha reportado que algunos ligandos hidrofóbicos (como ácidos grasos) inducen un cambio conformacional en la estructura terciaria de la AFP. Adicionalmente, aun cuando se ha demostrado que el estradiol no se une a la AFP humana bajo condiciones normales, se ha observado que el estradiol en concentraciones elevadas es capaz de inducir un cambio conformacional de AFP (Mizejewski GJ. Y cols 1995).

El cambio conformacional de AFP humana por ligandos tales como E2 (Goncharova O. y cols., 1999; Mizejewski GJ. y cols., 1986) se ha confirmado con cambios similares inducidos por ácidos grasos (c18 a c22) (Hsourigui M. y cols., 1992). Se ha detectado que el sitio activo expuesto seguido del cambio conformacional de AFP necesario para llevar a cabo el efecto antiproliferativo en diferentes líneas celulares se encuentra en el dominio carboxilo-terminal y se reduce a un péptido de 9 aminoácidos que ha sido sintetizado y purificado para utilizarlo para el desarrollo de posibles agentes terapéuticos (Mizejewski GJ. y cols., 1996).

Diversos estudios apuntan que existen tres posibles mecanismos por los que AFP realiza su función antiproliferativa, dichos estudios y métodos se enumeran a continuación:

1.- Hay reportes que han indicado que la AFP regula el crecimiento por inducción de la apoptosis en ensayos de cultivo celular, así la inhibición del crecimiento inducido por AFP involucra la transducción de señales, resultando en un efecto citotóxico. AFP aparentemente puede regular el crecimiento a través de la regulación de la apoptosis en células de hepatoma humano (Semenkova LN y cols., 1997). La apoptosis mediada por AFP es controlada vía Ca^{++} y es independiente de la vía de tirosin cinasas y no requiere síntesis de proteínas o RNA (Dudich I, y cols., 1998). Sin embargo, la apoptosis inducida por AFP en células tumorales como células Jurkat de linfoblastoma humano fue abrogada por interleucinas IL-2 endógena y exógena (IL-2) y por otros agentes inmunoreguladores (Semenkova LN. y cols., 1998). Estudios subsecuentes revelaron que la apoptosis mediada por AFP ocurre de manera independiente del receptor de TNF y Fas, y que AFP podría mediar señales regulatorias de crecimiento en células que presentan receptores para TNF (Dudich I. y cols., 1998). Fue determinado que AFP induce apoptosis en células Raji por activación de la caspasa 3 y, en cambio desvía la vía de señalización dependiente del receptor de TNF (Dudich E. y cols., 1988; Dudich E. y cols., 1999). La activación de la caspasa 3 por AFP fue independiente de la activación upstream (río arriba) de caspasas iniciadoras 1,8 y 9 con actividad de proteasa (Dudich E. y cols., 1998; Dudich I. y cols., 1999). En resumen, la AFP puede promover la

apoptosis de manera dependiente de la regulación negativa de las proteínas Bcl, Bcl_x-L y la cascada de señalización dependiente del receptor para TNF. Por otra parte, el grupo de Li y cols., (2004) observan una inhibición de FasL y TRAIL y un incremento en Fas y TRAILR en células de hepatoma humano, mientras que observan el efecto contrario en linfocitos y sugieren que la AFP puede jugar un papel en células de hepatocarcinoma promoviendo el escape de la vigilancia inmune. La presencia del posible receptor para AFP en células tumorales y linfocitos permite a AFP ser endocitada. La regulación de apoptosis por AFP en altas dosis (>100 µg/ml) inhibe el crecimiento de una variedad de células tumorales incluyendo hepatoma HepG2, linfoblastoma, MT4, linfoma Jurkat, fibroma murino, L-929 y MCF-7 derivada de cáncer de mama (Goncharova O. y cols., 1999). Bajas dosis de AFP (<100 µg/ml) no inhiben el crecimiento en algunas células probadas. Estos datos *in vitro* demostraron que AFP podría inducir y estimular la actividad inhibitoria del crecimiento, dependiendo de la relación entre concentración de AFP, citocinas exógenas-endógenas y factores de crecimiento en el medio de cultivo. Un estudio, empleando estradiol (E2) en altas concentraciones, induce un cambio conformacional en la molécula de AFP resultando en una significativa supresión del crecimiento de células MCF-7 (Goncharova O. y cols., 1999). AFP a dosis bajas (0.01 µM) pre incubadas en un exceso molar de E2, produce la supresión de estas líneas celulares derivadas de tumores, pero si AFP no es pre incubada con E2, no induce la apoptosis llevando a la citotoxicidad en esas células (Goncharova O. y cols., 1999; Bennett JA, y cols 1993; Festin, SM, y cols., 1999; Mizejewski GJ, y cols., 1983). Esto sugiere que el cambio conformacional en AFP es necesario para su unión al receptor.

2.- Un segundo estudio demostró que AFP es capaz de regular interacciones proteína-proteína, durante la cascada de señalización de MAP cinasa en células derivadas de cáncer de mama (Lobenhofer EK. y cols., 2000). AFP fue detectada en el compartimiento intracelular de células MCF-7 (Hajeri-Germond M. y cols., 1985), esto podría directamente afectar el proceso de transcripción. En contraste AFP ha sido localizado en la superficie celular: en receptosomas, endosomas, el retículo endoplásmico y espacios perinucleares dentro del citoplasma (Mizejewski GJ. Y cols., 1995; Torres JM. y cols., 1992; Naval J. y cols., 1985). Por lo tanto es concebible que AFP pueda interactuar con un receptor específico llevando a la célula a la unión a proteínas, activación de factores transcripcionales, cinasas, coactivadores y reguladores del ciclo celular en el citoplasma anterior a su translocación nuclear.

3.- El tercer método por el cual AFP o sus derivados peptídicos podrían modular el crecimiento celular puede involucrar la interrupción de traducción de señales de receptores acoplados a proteína G (EGFR) (Krupnick JG. y cols., 1997). AFP y sus péptidos podrían desensibilizar las señales de traducción mediadas por un receptor acoplado a proteína G y funcionalmente impedir la respuesta de crecimiento celular de múltiples tipos celulares incluyendo tumores. Así AFP y sus derivados peptídicos pueden servir como un segundo ligando a receptores acoplados a proteínas G y afectar la respuesta a la interacción mitogénica de MAPK MAP cinasa), que está involucrada en la proliferación celular. Tal vía podría representar un bloqueo de factores de crecimiento privando a la célula de su proliferación.

Como se ha comentado, existen péptidos de la región carboxilo-terminal de AFP que inhiben el crecimiento estimulado por estrógenos en injertos derivados de cáncer de mama (Tatarinov YS. 1965). Se ha estudiado mayormente un péptido con secuencia de EKTOVNOGN donde O es hidroxiprolina. Sin embargo, muchos péptidos no son activos administrados oralmente por la vulnerabilidad de las uniones peptídicas a los ácidos y las proteasas en el tracto

gastrointestinal. Por ello, este péptido fue ciclizado a través de una reacción de calentamiento uniendo el grupo amino terminal del grupo glutámico con el grupo α -carboxilo de la asparagina, para darle mayor estabilidad. Se ha reportado que este péptido previene el desarrollo del cáncer de mama en ratas Sprague Dowley inducidas por metilnitrosourea, esta protección fue dependiente de la dosis y requiere un mínimo de 10 días consecutivos de tratamiento del péptido de AFP (Brock DJH. y cols., 1972). Así estos estudios han mostrado que la ciclización de péptidos mostró ser una estrategia poderosa tanto para estabilizar las regiones farmacológicamente activas de los péptidos disminuyendo la susceptibilidad del rompimiento por metabolitos (Mizejewski GJ. y cols., 1985). James A. y cols., 2006 compararon la función biológica de péptidos ciclizados de AFP administrados por vía oral en tres sistemas de roedores comparados con los administrados por vía parenteral. Los resultados indicaron que la administración oral del péptido ciclizado de AFP retiene su actividad antiestrófica y es bien tolerado por las ratas o ratones que recibieron el tratamiento. Adicionalmente, estimula el estado de fosforilación del receptor de estrógenos.

2.6 EVIDENCIAS QUE APUNTAN LA EXISTENCIA DE UN RECEPTOR PARA ALFA FETOPROTEÍNA

La posible existencia de un receptor para AFP ha sido discutida durante varios años. Aun cuando el receptor no ha sido aislado ni identificado molecularmente, algunas evidencias apoyan la existencia de receptores para AFP en células MCF-7, HepG2, NIH 3T3, linfocitos-T y mioblastos, entre otras (Li MS. y cols 2002; Lorenzo HC. y cols., 1996; Torres JM. y cols., 1992; Villacampa MJ. y cols., 1984). La actividad bioquímica de la AFP está regulada por la unión preferencial de ácidos grasos insaturados sobre los saturados, activando una cascada endocítica, saturable y proteína dependiente. Los ácidos grasos poli insaturados libres también tienen efectos biológicos demostrables que incluyen la regulación de la acción de los esteroides y de enzimas de transducción de señales (Villacampa MJ. y cols., 1984). Sin embargo, no es claro que esto únicamente ocurra en su estado libre. La captación de los ácidos oleico y araquidónico por linfocitos T es mediada por el mismo mecanismo AFP específico (Torres JM, y cols.,1992). El proceso de internalización implica endocitosis dependiente de clatrina hacia endosomas y red de trans Golgi (Torres JM. y cols., 1991) ó por cuerpos endocíticos multivesiculares. Este patrón de localización subcelular de la AFP es similar al de la transferrina, sin embargo, el receptor de transferrina no es el responsable de la internalización de AFP (Geuskens M, y cols., 1989). La AFP es un mediador esencial de internalización celular de ácidos grasos insaturados por medio de un receptor putativo no identificado que es específico para AFP y que dirige la localización de AFP dentro de la célula. El octapeptido de AFP (EMTPVNPG) representa la secuencia mínima de unión al receptor. La función biológica del octapeptido de AFP no es compartida por su secuencia homóloga en albúmina humana (EKTPVSDR). Previamente se demostró que un esteroide (compuesto "lipid-like") es capaz de inducir un cambio conformacional en la proteína que incrementa su efecto biológico (Festin SM, y cols., 1999). Una posible explicación de esto sería que este cambio conformacional expone una parte oculta de AFP, aumentando su afinidad por el receptor. Experimentos de modelaje molecular, basados en la estructura tridimensional conocida de la albumina, que comparte un 37% de identidad con la secuencia de AFP (Swiss-Prot AC Q28789), indican que el octapéptido se encuentra en la superficie del tercer dominio de la AFP, en cercanía relativa al dominio I. La unión con lípidos puede inducir un cambio conformacional que expone esta secuencia, incrementando su actividad biológica entre 10 y 100 veces (Mesfin FB, y cols., 2000; Mesfin FB. y cols., 2001). Comparando con la albúmina, el modelo de AFP tiene un enlace iónico menos (Asp-Lys) entre los dominios I y III y

carece de un enlace disulfuro en el dominio II. Esto hace que la AFP sea mucho más flexible y más susceptible de sufrir cambios conformacionales. Es interesante que, aún cuando se ha reportado que la AFP humana no es capaz de unir estradiol, las concentraciones altas de estradiol parecen ser capaces de incrementar la afinidad de la AFP por su receptor.

Tres grupos han reportado la evidencia directa de la existencia de un receptor específico para AFP. Como se mencionó anteriormente, Villacampa MJ. y cols., utilizaron AFP marcada con I^{125} para identificar el receptor putativo en células MCF-7. La internalización de AFP en estas células es mediada por un receptor y es mayor a 37 °C, además de ser saturable y reversible, con constante de afinidad de 4.5×10^{-9} y 1.3×10^{-8} M, no es mediada por transferrina y es dependiente de una estructura celular sensible a tripsina (Villacampa MJ. y cols., 1984). Otro grupo ha desarrollado anticuerpos monoclonales contra el receptor, MABS 167H.1 y 167H.4 (Moro R. y cols., 1993). Estos anticuerpos antagonizan el receptor de AFP llevando a la internalización del anticuerpo. Estos anticuerpos claramente representan una herramienta poderosa para la identificación del receptor de AFP, sin embargo no existen evidencias que indiquen que se hayan utilizado exitosamente estos anticuerpos para la purificación del receptor de AFP. Este último grupo sugiere que existen dos subtipos de receptores con k_D diferentes que parecen activar las cascadas de AMP cíclico y PKC y calcio intracelular para regular la expresión de oncogenes como p53, k-ras y p21.

Por lo tanto, es esencial identificar los componentes de la maquinaria celular participan en la acción de la AFP así como el proponer una alternativa tecnológica para la búsqueda del receptor de AFP.

Por lo antes mencionado se tiene la necesidad de conocer qué tipo de receptor interacciona con AFP. Hemos propuesto una alternativa para detectar el receptor de AFP donde se utilizará AFP marcada con proteína verde fluorescente para tamizar una genoteca expresada en una línea celular que no exprese este receptor. La AFP así marcada se podrá detectar en el interior de la célula que exprese este receptor. Como primera etapa de investigación proponemos clonar AFP unida a la proteína verde fluorescente (GFP), tanto por su extremo amino como por el carboxilo, y comprobar que las proteínas de fusión mantengan los mismos efectos biológicos. Esto incluye los efectos antiestrotroóficos descritos y la internalización de AFP a células que expresen el receptor. Estos datos nos darán las herramientas para proponer una nueva estrategia molecular para la clonación de su receptor como segunda etapa de este trabajo de investigación. Los resultados de este trabajo contribuirán al desarrollo de nuevos blancos terapéuticos y proveerán información valiosa concerniente al mecanismo de acción de la AFP como agente en la lucha contra cáncer de mama.

OBJETIVO

Comprobar la actividad biológica de AFP unida a una proteína verde fluorescente en células derivadas de cáncer de mama MCF-7 estimuladas con estradiol, comparando su efecto biológico contra el efecto ya demostrado para tamoxifén.

1. OBJETIVOS PARTICULARES

I Desarrollar un enfoque experimental para determinar la actividad anticancerígena *in vitro* de AFP unida a una proteína verde Fluorescente.

- a. Clonar AFP fusionada a una proteína verde fluorescente (GFP)
- b. Montar ensayos moleculares para determinar la expresión de la proteína de fusión y purificarla parcialmente.

II Estudiar la actividad biológica de la proteína híbrida sobre la proliferación de células derivadas de cáncer de mama, MCF7.

III Determinar el efecto de GFP-AFP sobre la actividad transcripcional de ER mediante ensayos de luciferasa.

IV Determinar la presencia o ausencia de un receptor para AFP en diferentes líneas celulares utilizando citometría de flujo para visualizar la internalización de la proteína fluorescente. Nos interesa encontrar una línea celular que no exprese este receptor y que pueda ser utilizada para posteriormente llevar a cabo la clonación del receptor de AFP.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. CLONACIÓN DE AFP UNIDA A PROTEÍNA VERDE FLUORESCENTE.

Para clonar el gen de AFP con proteína verde fluorescente, se utilizó la metodología Gateway de Invitrogen. Este sistema emplea oligonucleótidos que presentan la secuencia CACC en extremo 5'. Los productos de PCR con los cuatro nucleótidos se acoplan con la secuencia GTGG en el vector de entrada pENTR TOPO. El gen de interés clonado en el vector de entrada es transferido a un vector de destino mediante recombinación homologa a través de la enzima clonasa. Los vectores destino contienen la proteína verde fluorescente (GFP) ya sea para clonarse en el extremo amino o carboxilo de la proteína de interés.

Se utilizaron los plásmidos pBlue-AFP y pRSET-AFP donados por el Dr. Stephen Festin (Hamilton College, NY) como templado. El plásmido pBlue-AFP contiene el péptido señal de AFP para la excreción de la proteína. Se diseñaron oligonucleótidos con la secuencia CACC inmediatamente antes del codón de inicio para amplificar la secuencia de AFP con y sin su péptido señal.

Se realizó la reacción de polimerasa en cadena (PCR) utilizando siguiente mezcla: Concentración final en 50 µl: 1X buffer de reacción; 100 ng DNA, 0.2 mM dNTP's, 0.4 µM Oligo 5'; 0.4 mM Oligo 3'; 1.5 mM MgCl; 3-5% DMSO; 0.1 µl pfu polimerasa y 0.3 µl Taq polimerasa.

Los oligos se diseñaron con los sitios de restricción Xho1 en el oligo N-terminal y EcoR1 en el oligo C-terminal (sitios sombreados y subrayados)
Secuencia de oligos:

AFP-N 5' caccATAACT CGA GCCATGAAGTGGGTGGAATC'3 (PÉPTIDO SEÑAL)

AFP-N 5' caccACTCGAGCCATGACACTGCATAGAAATG '3 (SIN PÉPTIDO SEÑAL)

AFP-C 5' GAA GAA TTC ACT CCC AAA GCA GCA G'3

Las condiciones de PCR fueron:

1 ciclo de 5 minutos a 94 °C

15 ciclos de 1 minuto 94 °C, 1 minuto 55 °C y 2 minutos 42 °C

1 ciclo de 10 minutos a 72 °C

Se corrió gel de agarosa al 1%, el fragmento de PCR esperando un fragmento de 1.8 kb. Los productos de PCR fueron purificados a partir del gel utilizando el kit de purificación de Qiagen y siguiendo las instrucciones del fabricante. Se determinó la concentración del producto de PCR utilizando un espectrofotómetro.

El DNA amplificado se insertó en el vector de entrada pENTR siguiendo las instrucciones del fabricante (Invitrogen) (Fig. 6), utilizando 10 ng del producto de PCR con 1 µl del plásmido de entrada. Se incubó la reacción durante 10 minutos en hielo y se transformaron células competentes One Shot Top10 (Invitrogen) creciendo en presencia de kanamicina 50 µg/ml

Se realizaron extracciones de DNA plasmídico mediante lisis alcalina usando protocolos estándar. Los plásmidos purificados de pENTR-psAFP (con péptido señal) y pENTR-AFP (sin péptido señal) se cortaron con las enzimas de restricción Xho1 (amino) y EcoR1 (carboxilo) para determinar que el tamaño del inserto fuera el esperado (1.8 kb) y con Not1 (sitio dentro del vector) y EcoR1 para determinar que la orientación fuera correcta dentro del plásmido.

Digestión:

5 μ l de Buffer II (Invitrogen)

2 μ l de DNA

1.5 μ l de cada enzima

39.8 μ l de H₂O

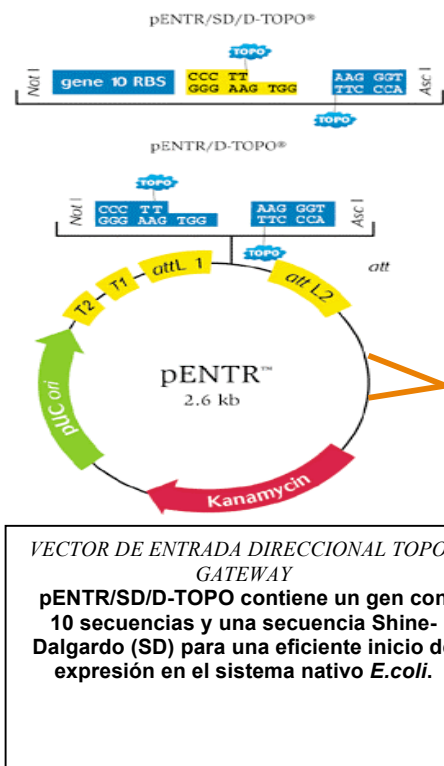
Posteriormente, los plásmidos se secuenciaron para comprobar la ausencia de mutaciones en el gen de AFP.

2. CLONACIÓN EN EL VECTOR DE DESTINO.

Se utilizó el plásmido pDEST 47 para generar una construcción que fusiona a GFP en el extremo carboxilo de AFP con péptido señal y el vector de destino pDEST 53 para generar una construcción con la GFP en el extremo amino de la secuencia AFP quitando el péptido señal.

Se mezclaron los siguientes compuestos: 2 μ l de vector de entrada (100 ng/ μ l), 4 μ l de Buffer de Reacción de LR clonasa (5x), 1 μ l de vector pDEST 47 o 53 (vector de destino) y 9 μ l de TE. Se adicionaron 4 μ l de LR clonasa a la reacción, se mezcló por medio de vortex y se incubó toda la noche. Posteriormente, se adicionó proteinasa K y se incubó 10 minutos a 37 °C y se realizó una transformación utilizando 1 μ l de la reacción en 50 μ l de células ultra competentes DH5 α . Se incubaron la células en hielo por 30 minutos, posteriormente se les dio un choque térmico a 42 °C por 30 segundos se adicionaron 450 μ l de medio SOC y se incubó la reacción a 37 °C por una hora. Se plató la mezcla en placas LB con 100 μ g/ml de ampicilina. Los plásmidos se purificaron y se secuenciaron para comprobar que las secuencias estuvieran en el mismo marco de lectura.

Figure 1 - Gateway® Directional TOPO® entry vector



RECOMBINACION HOMOLOGA con LR clonasa

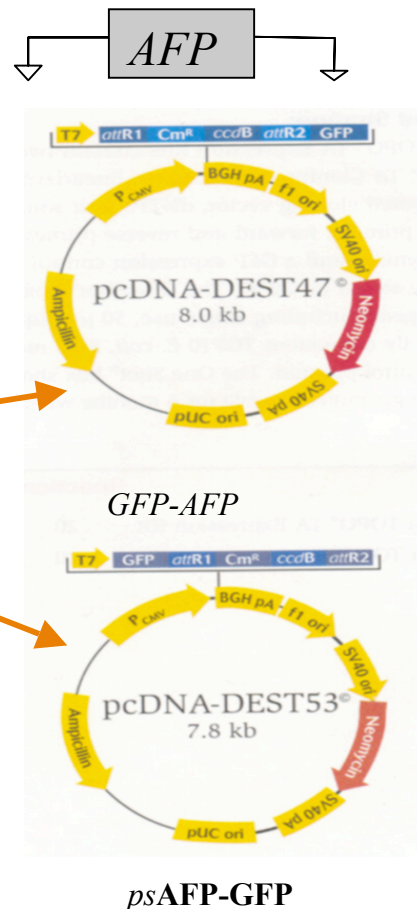


Figura 6. Sistema GATEWAY (Invitrogen).

3. TRANSFECCIÓN EN CÉLULAS COS-7.

Se utilizaron células COS-7 de riñón de mono para sobreexpresar las proteínas de fusión psAFP-GFP y GFP-AFP. Las células COS-7 se mantienen en medio DMEM con alta glucosa adicionado con 20 mM HEPES, 2 mM glutamina, penicilina, streptomycin y 5% de suero fetal bovino (SFB).

Para establecer si se expresan adecuadamente las dos proteínas de fusión se realizó western blot de las proteínas expresadas. Para ello, 5×10^5 células se crecen en cajas de 6 pozos hasta una confluencia de 70-80 % y se realizó el ensayo de transfección con 1 mg de plásmido utilizando lipofectamina 2000 (Invitrogen) y siguiendo las instrucciones del fabricante, de la siguiente manera:

- Se diluyó 1 µg de DNA en 125 µl de DMEM blanco sin SFB ni antibiótico por cada pozo.
- Se diluyeron 2 µl de lipofectamina 2000 en 125 µl de medio blanco sin SFB ni antibiótico por cada pozo incubando 5 minutos.
- Se incubó la mezcla de lipofectamina + DNA por 30 minutos en un volumen total de 250 µl.
- Se lavaron las cajas con PBS 1X dos veces y se agregó 1 ml de medio DMEM sin SFB ni antibiótico.
- Se agregaron los 250 µl de la mezcla lipofectamina + DNA en cada pozo.
- Se incubó toda la noche y se cambió el medio de cultivo por medio con 5% suero fetal bovino
- La proteína AFP-GFP fue purificada a las 48 hrs a partir del sobrenadante, mientras que la GFP-AFP fue purificada a partir de lisados celulares.

4. LISIS CELULAR.

Se tomó una caja de cultivo de 6 pozos con células COS-7 ya transfectadas con 1 µg de plasmido y se visualizó previamente por microscopía de fluorescencia la transfección de la construcción GFP-AFP. Las células se lavaron con PBS 1X, y se añadió 1 ml Buffer de lisis con amortiguador de fosfatos pH 7.8 (9.15 ml de K₂HPO₄ 100 mM, 0.85 ml de KH₂PO₄ 100 mM) adicionado con 1 mM DTT en cada pozo, agregado al momento de usar y se mantuvo en hielo. Se desprendieron las células se transfirió el disgregado celular a tubos eppendorf de 1.5 ml y se guardó a -70 °C.

De las cajas transfectadas con la construcción psAFP-GFP que presenta un péptido señal se recuperó el sobrenadante celular. Se concentró el sobrenadante por diálisis sobre una cama de sacarosa a 4 °C durante 3 horas, posteriormente se transfirió a tubos eppendorf y se guardó a -70 °C.

5. PRECIPITACIÓN CON SULFATO DE AMONIO A 4 °C.

Se precipitó tanto el extracto celular de la construcción GFP-AFP como el sobrenadante concentrado de AFP-GFP con diferentes porcentajes de sulfato de amonio. Para esto se pesaron las siguientes cantidades de sulfato de amonio disueltas en 50 ml de agua destilada:

Porcentaje Sulfato de Amonio	Cantidad Disuelta en 50 ml
20%	0.675 g
40%	5.65 g
60%	12.05 g
80%	19.35 g
100%	27.85 g

Tabla1. Preparación de porcentajes de Sulfato de Amonio.

Se mezclaron 10 ml de cada concentración, por separado, de sulfato de amonio con 35 µg de cada construcción y se incubaron en agitación durante 15 minutos a 4°C.

Cada muestra se centrifugó a 2500 rpm por 10 minutos a 4 °C, se retiró el sobrenadante y el botón se resuspendió en 10 ml de agua destilada y se guardaron las muestras en alícuotas de 1 ml a -70 °C.

Se determinó en que concentración se precipitaban las proteínas de fusión a través del método de Western Blot.

6. WESTERN BLOT.

Se corrieron las muestras en geles desnaturizantes de poli(acrilamida) al 10% para la electroforesis. Se tomó una alícuota de 10 µl de la muestra, se diluyeron en buffer de carga y se colocaron las muestras en cada pozo y se corrió a 80 volts por 45 minutos. Una vez terminada la electroforesis, se transfirió a una membrana de PVDF (Hybond P, GE Healthcare) siguiendo las indicaciones del fabricante. La transferencia se realizó a 20 volts, toda la noche, a 4 °C

Una vez realizada la transferencia, se llevó a cabo la detección de la proteína utilizando una dilución de 1:5000 del anticuerpo contra AFP (Santa Cruz Biotechnology) o del anticuerpo contra GFP (Invitrogen). El anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa de raíz fuerte se utilizó a una dilución de 1:10,000 en TBST (1.21 g/L Tris, 8.76 g/L NaCl, 0.5 ml Tween 20). Las membranas se revelaron por quimioluminiscencia sobre placas de rayos X (Kodak X-OMAT). Se corrieron geles para ser teñidos con azul de coomasie (Bio-Rad) para determinar el nivel de pureza de las proteínas.

Una vez encontrada la concentración de sulfato de amonio en la cual se precipita nuestra proteína de interés, se realizó la determinación de la concentración proteica utilizando el kit de ácido bicinconinico (BCA) de Bio-Rad.

7. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LAS CLONAS.

7.1. ENSAYO DE PROLIFERACIÓN.

Para determinar si las proteínas híbridas mostraban la misma actividad biológica que ha sido demostrada para la AFP nativa, nos propusimos medir el efecto que tiene la AFP-GFP sobre la proliferación mediada por estrógenos en células MCF-7 de cáncer de mama. Se sabe que en esta línea celular, la proliferación se incrementa en presencia de estrógenos y que el tamoxifén inhibe el crecimiento al competir por el sitio de unión del estradiol. Adicionalmente, se ha demostrado que la AFP o sus péptidos, inhiben el crecimiento dependiente de estradiol. Para ello se utilizó el método de MTT. Este es un ensayo colorimétrico basado en la capacidad selectiva de de las células vivas para reducir, por respiración mitocondrial, las sales amarillas de MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) a azul de formazan. Los valores determinados en el espectrofotómetro a 570 nm, nos dan una medida relativa del número de células vivas presentes en el pozo.

Las células MCF7 se mantienen en medio DMEM/F12 adicionado con antibióticos y 5% de SFB y se crecen a 37 °C en 5% CO₂. Sin embargo después de tripsinizar las células, todos los ensayos se realizaron en medio DMEM/F12 sin rojo fenol con 0.2% SFB tratado con carbón dextrán (SFB-CS). El tratamiento con carbón dextrán se utiliza para eliminar las hormonas que se encuentran en el suero.

Inicialmente, se estandarizó el ensayo para ver que concentraciones de células se iban a utilizar. Se hicieron diluciones seriadas de las células para utilizar 6 concentraciones diferentes de células (ver protocolo). Se utilizaron los siguientes tratamientos durante el experimento de estandarización de la gráfica 15.

- 1) Vehículo (Etanol)
- 2) E2 10 nM
- 3) E2 100 nM
- 4) Tamoxifén 100 nM
- 5) E2 10nM + tamoxifén 100 nM

Una vez estandarizado el método de MTT, se repitió el experimento en presencia y ausencia de extractos totales o parcialmente purificados de AFP-GFP o GFP-AFP preincubados o no durante 2 h a 4 °C con E2 100 nM para crear un cambio conformacional que active a la

molécula (Gráfica 16). Las células se incubaron con 10 nM de E2 para promover proliferación. En base a los resultados anteriores, se utilizó la fracción precipitada con sulfato de amonio al 80%. El experimento se realizó de la misma manera bajo las siguientes condiciones:

- Medio
- E2 10nM.
- E2 10 nM + 15 µg Extracto total GFP-AFP.
- E2 10 nM + 15 µg Extracto total GFP-AFP, preincubado 2h con E2 100nM.
- E2 10 nM +1.5 µg fracción de 80% GFP-AFP.
- E2 10 nM +1.5 µg fracción de 80% GFP-AFP, preincubado 2h con E2 100nM.

Los extractos que contienen AFP se adicionaron intactos después de una preincubación de 2h con 100 nM E2.

Todos los experimentos fueron realizados al menos 5 veces por triplicado. Se calculó el error estándar

Adicionalmente, se estudiaron los efectos de la proteína híbrida invertida, psAFP-GFP que se purificó a partir del sobrenadante de las células transfectadas. Se realizó el experimento de la misma manera, bajo las siguientes condiciones:

- Medio
- E2 10nM.
- E2 10 nM + 15 µg Extracto total GFP-AFP.
- E2 10 nM + 15 µg Extracto total GFP-AFP, preincubado 2h con E2 100nM.
- E2 10 nM +1.5 µg fracción de 80% GFP-AFP.
- E2 10 nM +1.5 µg fracción de 80% GFP-AFP, preincubado 2h con E2 100nM.
- E2 10 nM +15 µg extracto total sin transfectar.
- E2 10 nM + 15 µg GFP COOH.
- E2 10 nM + 15 µg sobrenadante total de psAFP-GFP.
- E2 10 nM + 5 µg psAFP-GFP preincubado 2h con E2 100nM

PROTOCOLO:

1. En una caja de cultivo T75 para cultivo celular se creció la línea celular MCF-7 (medio DMEM/F12 y SFB al 5%).
2. Las células se crecieron hasta llegar a una confluencia entre 70-80%. Se despegaron con 1 ml de tripsina 2 minutos a 37 °C y se le adicionaron 3 ml de medio DMEM y se pasó a un tubo de 15 ml, posteriormente se centrifugaron las células 5 minutos a 4 °C a 2000 rpm. Se retiró el medio y el pellet fue resuspendido en 3 ml de medio DMEM/F12. Las células se contaron en la cámara de Neubauer y se diluyeron hasta llegar a una dilución de 5×10^5 células/ml en 4 ml de medio DMEM blanco. A partir de esta concentración se diluyeron las células sucesivamente en medio hasta que se obtuvieron las siguientes diluciones: 1) 2.5×10^5 c/ml; 2) 1.25×10^5 c/ml; 3) 0.65×10^5 c/ml; 4) 0.312×10^5 c/ml; 5) 0.156×10^5 c/ml; 6) 0.075×10^5 c/ml. Se tomaron 100 μ l de cada dilución en placas de 96 pozos, se trabajaron todos los experimentos por dilución en triplicado. El total de células por pozo (100 μ l) fueron: 1) 2500 c/pozo, 2) 1250 c/pozo, 3) 625 c/pozo, 4) 312 c/pozo, 5) 156 c/pozo, 6) 78 c/pozo. Se cultivan durante 6 días en presencia de cada tratamiento. Al final de este tiempo, se agregan 10 μ l de reactivo MTT a cada pozo, se incuban de 2-4 horas a 37 °C. Al finalizar el tiempo de incubación se midió mediante espectrofotometría a una densidad óptica de 570 nm la producción de azul de formazan como producto final.

7.2. ENSAYOS DE LUCIFERASA.

Para determinar el efecto que tienen las proteínas recombinantes psAFP-GFP y GFP-AFP sobre la actividad transcripcional del ER α , se realizaron ensayos en células MCF7 de cáncer de mama (que expresan al ER α) utilizando un gen reportero de luciferasa que contiene elementos de respuesta a estrógenos. La transfección se realizó en placas de 24 pozos con 80,000 células MCF7 por pozo en medio DMEM/F12. 24 horas después de ser transfectadas se transfirieron 200 ng del plásmido reportero 3xERE-Luc y 10 ng de un vector de expresión de β -galactosidasa como control para normalizar la eficiencia de transcripción. La transfección se llevó a cabo utilizando lipofectamina 2000 (Invitrogen) y siguiendo las indicaciones de fabricante. Al día siguiente, se lavan las células y se cambia el medio a medio DMEM/F12 sin rojo fenol con 0.2% SFB-cs y se realizan los siguientes tratamientos:

- Sin hormona
- E2 10 nM
- 10 nM E2 + 15 μ g Extracto total GFP-AFP + preincubado 2h con 100 nM E2.
- 10 nM E2 + 1.5 μ g Fracción 80% GFP-AFP + preincubado 2h con 100 nM E2.
- 10 nM E2 + 15 μ g Sobrenadante psAFP-GFP + preincubado 2h con 100 nM E2.
- 10 nM E2 + 1.5 μ g Fracción 80% psAFP-GFP + preincubado 2h con 100 nM E2.

- 10 nM E2 + 15 µg Extracto total sin transfectar + preincubado 2h con 100 nM E2.
- 10 nM E2 + 15 µg sobrenadante sin transfectar + preincubado 2h con 100 nM E2.
- Plásmido psAFP-GFP + preincubado 2h con 100 nM E2 (Cotransfección).

Después de 48 horas, se lavan los pozos dos veces con PBS y se lizan las células en 50 µl buffer de fosfatos pH 7.8 (9.15 ml K₂HPO₄ 100 mM y 0.85 ml K₂HPO₄ 100 mM) adicionado con 0.2% Tritón X-100 y 10 nM DTT. Los pozos se raspan y se toman 30 µl de lisado y se colocan en tubos para las lecturas de luciferasa. El luminómetro inyecta 150 µl de buffer de Reacción de luciferasa [25 mM Glicil-glicina- 0.5 M, pH 7.8 (frio), 15 mM MgCl₂, 5 mM ATP pH 7.8 (frio), 0.5 mg/ml BSA] y 30 µl de Luciferina 100 mM. La lectura se realiza durante 20 segundos.

7.3. CITOMETRÍA DE FLUJO.

Para determinar si nuestras proteínas recombinantes eran capaces de ser endocitadas, se midió la actividad de unión de AFP a su receptor por citometría de flujo. Se utilizaron las líneas celulares LNCaP, COS-7, HeLa, CV-1, HepG2 y MCF-7. Las células fueron crecidas en cajas de cultivo T75 hasta que llegaron a una confluencia de 70%. Antes de realizar la medición, se pre incubaron 1.5 µg/ml de la construcción GFP-AFP 80% con estradiol al 100 nM en 1 ml de medio de cultivo DMEM s/SFB durante 2 horas. Después de este tiempo se incubó cada una de las líneas celulares con la mezcla GFP-AFP+100 nM E2 durante 2 h. Se despegaron las células con buffer de lisis, se lavaron dos veces con PBS 1X, se tomó una alícuota de 100 µl en 0.5 ml de PBS 1X y se determinaron las células que hubieran endocitado la fluorescencia de acuerdo al protocolo del fabricante (Becton Dickinson, Heidelberg, Germany), se uso el programa CellQuest, se midió la intensidad fluorescente verde en el canal (MFI), se usaron células sin incubación como blanco (control).

RESULTADOS

1. CLONACIÓN DE AFP UNIDA A UNA PROTEÍNA VERDE FLUORESCENTE (GFP).

La AFP ha demostrado tener un efecto antiproliferativo en varias líneas celulares derivadas de cáncer. Sin embargo, no se conocen completamente los mecanismos mediante los cuales realiza esta función biológica. Se piensa que la AFP actúa a través de un receptor membranal específico que está involucrado directamente en este efecto. Por esta razón, la meta a largo plazo es clonar y caracterizar al receptor de AFP para estudiar el mecanismo mediante el cual realiza su función biológica. Para ello, se ha dividido este objetivo en dos etapas: la primera involucra obtener una herramienta adecuada, en este caso a la AFP fusionada con GFP, que nos permita visualizar la interacción de AFP con su receptor para determinar que líneas celulares expresan al receptor y cuales no lo expresan. La segunda etapa involucra utilizar una línea celular que no exprese al receptor de AFP para transfectar una genoteca de expresión de HepG2 o MCF7, que expresan el receptor de AFP, y mediante nuestras proteínas híbridas determinar cuales células transfectadas internalizan al receptor y así determinar su identidad.

Así, como primer objetivo de este proyecto, AFP fue clonada en vectores de expresión en mamíferos con GFP fusionado al extremo amino- ó carboxilo-terminal (en los vectores de Clontech EGFP-N1 y EGFP-C1 y en vectores Gateway pDEST 47 y pDEST 53) para determinar cuál configuración permite una mejor unión y se pueda identificar fácilmente. Inicialmente por microscopia de fluorescencia y después por citometría de flujo. Se pensó en dos construcciones ya que el mismo diseño podría evitar la unión de AFP con su receptor, especialmente sabiendo que el sitio de unión al receptor se encuentra en la región carboxilo-terminal. Adicionalmente, se diseñó la construcción que tiene GFP unida a la región carboxilo-terminal con el péptido señal de la AFP lo cual permite que la proteína se excrete al medio de cultivo.

Como primer paso se realizó un PCR utilizando como templado el plásmido pBLUE-AFP clonado por el Dr. Stephen Festin de la Universidad de Hamilton de NY. Los oligos N-terminales se diseñaron con una secuencia CACC en su extremo 5', la cual es necesaria para poder ingresarla en el marco de lectura al plásmido de entrada (pENTR GATEWAY "Invitrogen") que presenta la secuencia complementaria GTGG. Adicionalmente, se incorporaron secuencias para las enzimas de restricción Xho I (amino) y EcoRI (carboxilo). Se amplificaron secuencias de AFP con péptido señal y sin péptido señal. La secuencia amplificada de AFP mide 1800 pb.

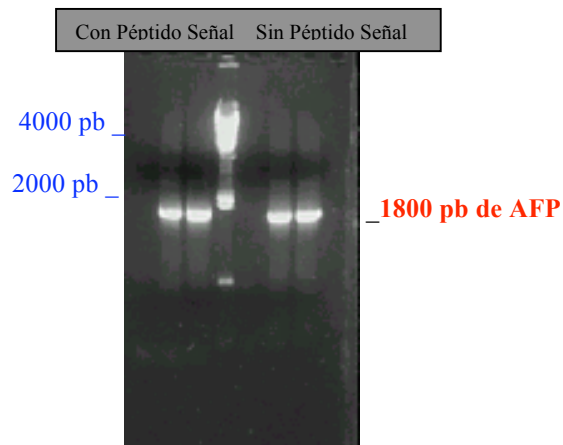


Figura 7. PCR plásmido pBlue AFP. Se corrieron productos de PCR. En los dos primeros carriles se observan productos que corresponden al fragmento que incluye AFP completa con péptido señal, el siguiente carril el marcador de peso molecular y en los carriles siguientes el DNA de AFP completa sin péptido señal.

Los productos de PCR se ingresaron al vector de entrada pENTR (GATEWAY) para obtener pENTR-psAFP (con péptido señal) y pENTR-AFP (sin péptido señal). Los productos de PCR con los cuatro nucleótidos se acoplan con la secuencia GTGG en el vector de entrada pENTR asegurando que se mantenga el marco de lectura en los plásmidos de Gateway. La reacción se transformó en células competentes TOP 10 y se platearon con medio LB+ Kanamicina. De las colonias obtenidas se realizó un miniprep (extracción de DNA plasmídico) para cada muestra y posteriormente se realizó una digestión con las enzimas XhoI y EcoRI para comprobar la presencia del inserto de AFP.

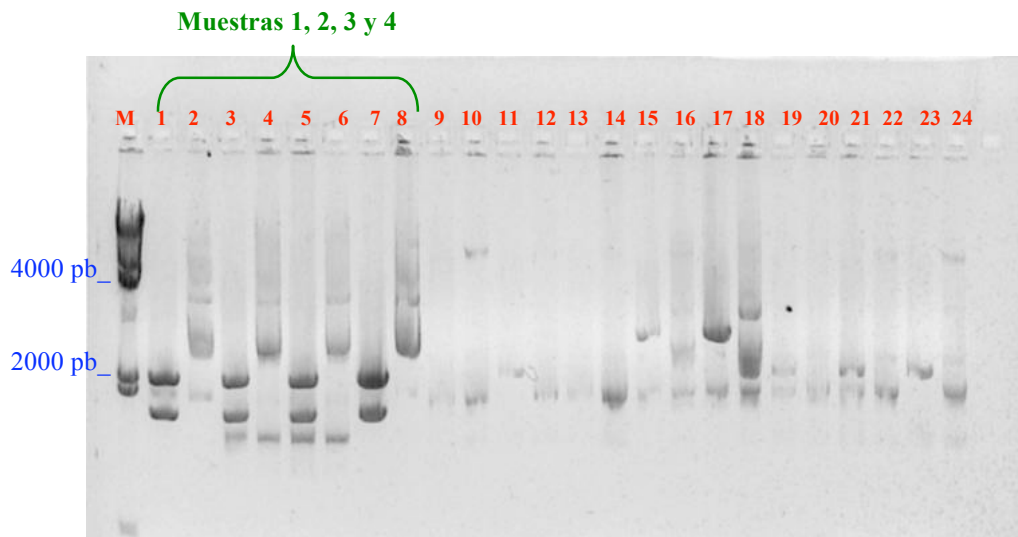


Figura 8. Minipreparación de DNA plasmídico obtenido de la ligación de AFP en pENTR (Gateway). En los carriles nones se encuentran plásmidos digeridos con XhoI y EcoRI. Los carriles pares muestran el control sin digerir de cada una de las preparaciones de DNA. Las muestras 1-2, 5-6, 9-10, 13-14, 17-18 y 21-22 corresponden a la muestra sin péptido señal pENTR-AFP y las muestras 3-4, 7-8, 11-12, 15-16, 19-20 y 23-24 a pENTR-psAFP con péptido señal.

Cada muestra digerida fue corrida incluyendo su control sin digerir, así en el caso del carril 1 se digirió la muestra 1 y se corrió en el carril 2 su control sin digerir así se realizó en todos los

casos. Las primeras 4 muestras muestran el inserto esperado de 1800 pb del inserto y 2580 pb del vector.

Además de las secuencias para las enzimas de restricción XhoI y EcoRI insertadas en los oligos de amplificación, el vector de entrada presenta las secuencias de corte para las enzimas de restricción EcoRV (carboxilo), NotI y XbaI (amino). Con estas enzimas se realizaron nuevamente digestiones de las muestras 1,2,3 y 4 obtenidas del experimento anterior para asegurar una orientación correcta de las secuencias de interés (figura 9). Se obtuvieron los fragmentos esperados (tamaño del inserto 1800 y vector 2580), los cuales son presentados en el siguiente gel.

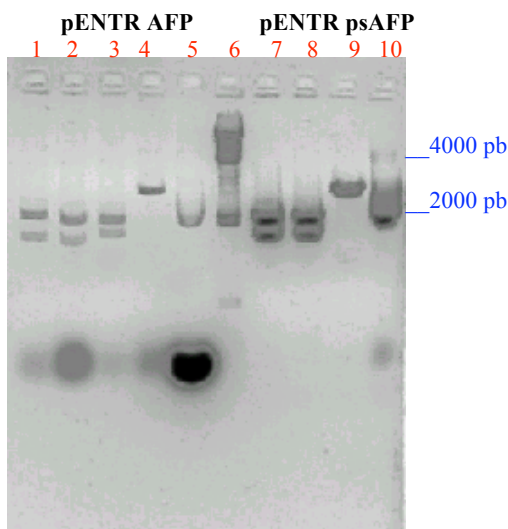


Figura 9. Comprobación de la orientación correcta de la secuencia para AFP en el vector. Digestiones de las muestras pENTR-AFP (muestras de los carriles 1-5) carril 6 marcador de peso molecular y muestra pENTR-psAFP (carriles 7-10) del experimento anterior digeridos de la siguiente manera: Carriles: 1) digestión EcoRI/XhoI; 2) digestión EcoRI/NotI; 3) digestión XhoI/EcoRV; 4) digestión XbaI/XhoI; 5) control sin digerir; 6) Marcador; 7) digestión EcoRI/NotI; 8) digestión EcoRI/NotI; 9) digestión XbaI/XhoI; 10) control sin digestión.

Las dos muestras fueron sometidas a PCR, y se obtuvo que en ambos casos amplificación de los fragmentos tanto para AFP con péptido señal y sin péptido señal.

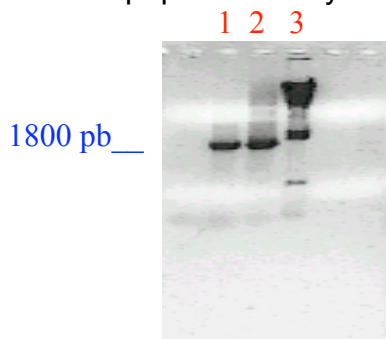


Figura 10. Comprobación de los insertos a través de PCR. La figura muestra la amplificación de los productos de PCR y estos fueron corridos en un gel de agarosa 1%, de la siguiente manera: 1) pENTR AFP; 2) pENTR psAFP con péptido señal; 3) marcador de peso molecular.

Las muestras se mandaron a secuenciar y se comprobó que ambas muestras corresponden a AFP y que no presentan mutaciones. El gen de interés en el vector de entrada fue transferido por recombinación homóloga a un vector de destino que expresa GFP (pDEST47) del lado carboxilo del inserto de interés y otro vector de destino que expresa en el lado amino de GFP (pDEST53). Se pensó clonar la AFP con GFP de ambos lados para determinar si pudiera haber interferencia de la GFP en la actividad antiestrogénica de AFP, ya que se sabe que la interacción de AFP con su receptor se realiza a través de su lado carboxilo (Seal W y cols., 1998; Resnick EM y cols., 2000). Este procedimiento se llevó a cabo a través de recombinación homóloga usando la enzima clonasa (Invitrogen). De la mezcla se transformaron células de *E. coli* DH5 α y después de algunos intentos se obtuvieron colonias a partir de las cuales se recobraron los plásmidos a través de miniprep y estos fueron nuevamente digeridos. Se obtuvieron dos construcciones: psAFP-GFP se encuentra en el plásmido pDEST47 y GFP-AFP en el plásmido pDEST53. Se realizaron digestiones utilizando la enzima XhoI, debido que dentro de la secuencia de GFP existe una secuencia de corte. En el caso de la construcción psAFP-GFP (que contiene péptido señal), esperábamos obtener un inserto de 2300 pb. Para la construcción GFP-AFP, con dicha enzima se espera obtener un fragmento de 600 pb. Los resultados son mostrados en los siguientes geles:

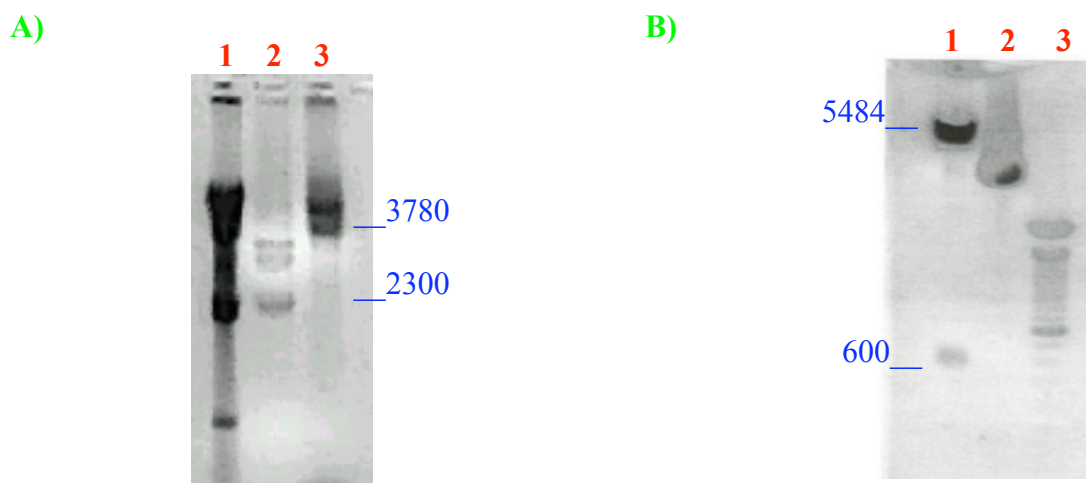
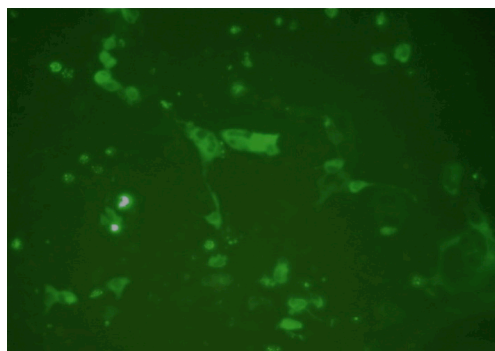


Figura 11. Digestión de las construcciones GFP-AFP y psAFP-GFP. Se digirieron las construcciones AFP-GFP con péptido señal y GFP-AFP para determinar la presencia de los insertos en orientación correcta. En la figura A) se corrieron las muestras de psAFP-GFP de la siguiente forma: carril 1 marcador de peso molecular; carril 2 muestra sin digerir; carril 3 digestión con la enzima de restricción Xho I. En la figura B) Clona GFP-AFP, se corrieron las muestras de la siguiente forma: carril 1 digestión con la enzima de restricción Xho I; carril 2 muestra sin digerir; carril 3 marcador de peso molecular.

2. EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE AFP.

Las construcciones GFP-AFP y psAFP-GFP fueron transfectadas en células COS-7 utilizando lipofectamina 2000 (Invitrogen). Las células estaban 80% confluentes durante el procedimiento. Las células fueron visualizadas por microscopia con fluorescencia después de 24 y 48 horas para determinar los niveles de transfección. Los resultados se muestran a continuación:

GFP-AFP



psAFP-GFP

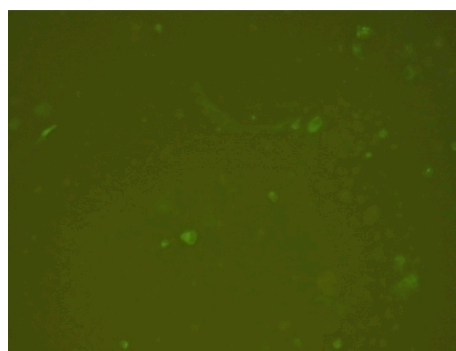


Figura 12. Transfecciones con las construcciones GFP-AFP y psAFP-GFP en células COS-7.

Como se muestra, la eficiencia de transfección de las células transfectadas con la construcción GFP-AFP fue alta ($\pm 40\%$). Por otra parte, es difícil determinar la eficiencia de transfección en las células transfectadas con la construcción psAFP-GFP ya que cabe recordar que la proteína expresada es transportada hacia el sobrenadante, de donde fue recuperada.

Las células transfectadas con GFP-AFP se mantuvieron en medio DMEM blanco sin suero a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ y 5% CO_2 aproximadamente 12 horas (toda la noche), posteriormente se retiró el medio se lavaron con PBS 1X y se adicionó nuevo medio DMEM blanco sin suero, a las 24 horas se observó en el microscopio de fluorescencia. Finalmente, fueron tratadas con buffer de lisis para la recuperación de la proteína expresada. En el caso de las células transfectadas con psAFP-GFP, se recuperó el sobrenadante 24 horas después de la transfección. La proteína se recuperó del sobrenadante y se concentró por diálisis depositando la bolsa de diálisis en una cama de azúcar a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ toda la noche. Los extractos protéicos se fraccionaron por precipitación con diferentes concentraciones de sulfato de amonio a 0° (de 20-100%). Posteriormente, se realizó un western blot para determinar en que fracción estaba nuestra proteína de interés. El peso molecular calculado en base a las secuencias es de 93 kDa.

A continuación se presenta el western blot mostrando los resultados que se obtuvieron durante esta etapa experimental utilizando anticuerpos contra AFP. Adicionalmente, se utilizó un anticuerpo policlonal contra GFP (dato no mostrado) para estar seguro que se tratara de nuestra proteína de interés.

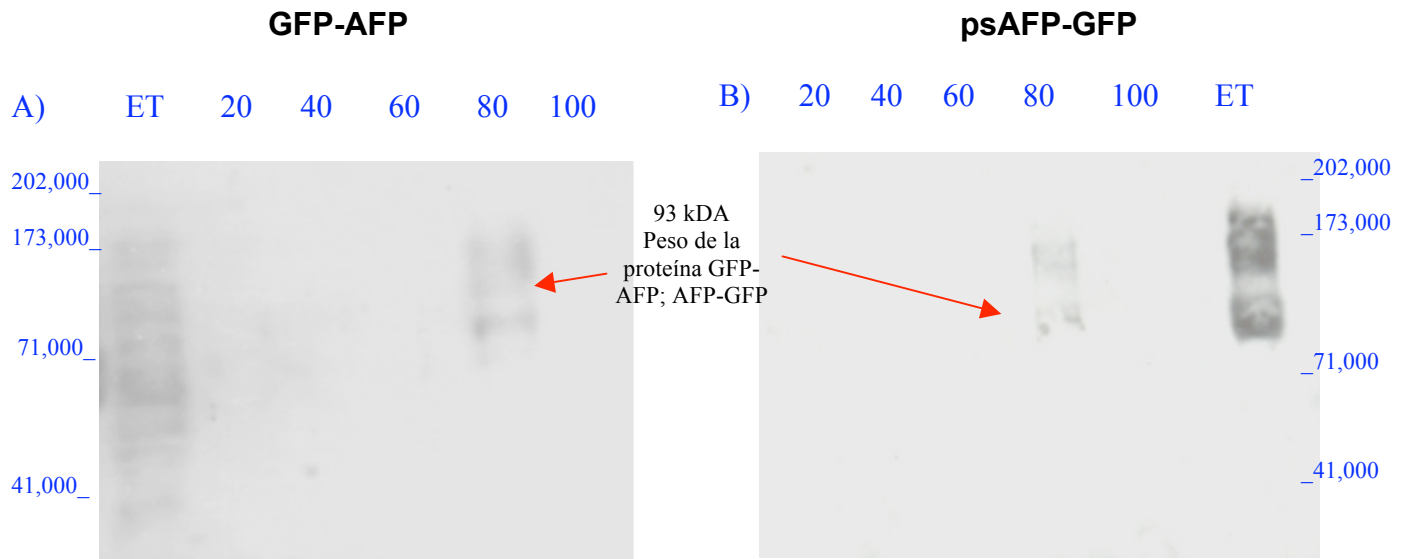


Figura 13. Western Blot de las proteínas GFP-AFP y AFP-GFP precipitadas con diferentes concentraciones de sulfato de amonio, utilizando un anticuerpo contra AFP. ET=extracto total; los números superiores representan el porcentaje de sulfato de amonio con que se precipitaron los extractos protéicos.

La precipitación proteica con 80% de sulfato de amonio mostró ser la más eficiente para purificar tanto GFP-AFP como psAFP-GFP (figura 13). Además la membrana de nitrocelulosa fue teñida con coomassie para determinar el nivel de purificación de la proteína híbrida. Los resultados muestran las proteínas precipitadas por Sulfato de amonio al 80%.

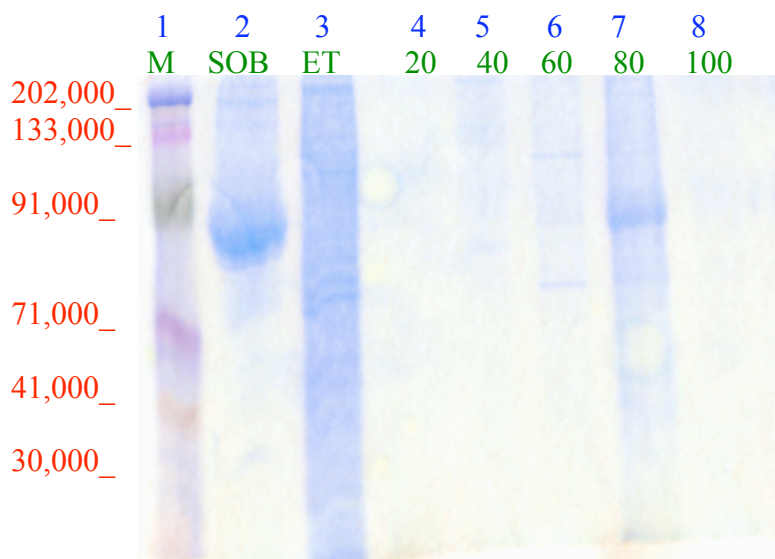


Figura 14. Corrimiento de proteína teñida con coomassie. Carriles: 1) Marcador de Peso Molecular; 2) Sobrenadante total psAFP-GFP; 3) Extracto total GFP-AFP; 4) Fracción 20% GFP-AFP; 5) Fracción 40% GFP-AFP; 6) Fracción 60% GFP-AFP; 7) Fracción 80% GFP-AFP; 8) Fracción 100% GFP-AFP.

3. PROLIFERACIÓN CELULAR.

Como primer paso para demostrar la funcionalidad de la proteína GFP-AFP se estandarizó el ensayo de proliferación usando el ensayo de MTT. En este ensayo, se utiliza espectrofotometría para detectar azul de formazan como producto final de proliferación. Este ensayo está basado en la capacidad selectiva de las células vivas para reducir, por respiración mitocondrial, sales amarillas de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) a azul de formazan. Dicho ensayo nos permitió determinar si nuestras proteínas recombinantes funcionan de manera similar a la proteína nativa como ya ha sido documentado, es decir si logran inhibir la proliferación inducida por estradiol de células derivadas de cáncer de mama MCF-7. Los tratamientos utilizados fueron 10 nM y 100 nM de E2, 100 nM de Tamoxifén y un último tratamiento de estradiol 10 nM más tamoxifén 100 nM. Utilizamos diferentes concentraciones celulares y todos los tratamientos fueron aplicados durante 6 días.

PROLIFERACIÓN EN CÉLULAS MCF-7

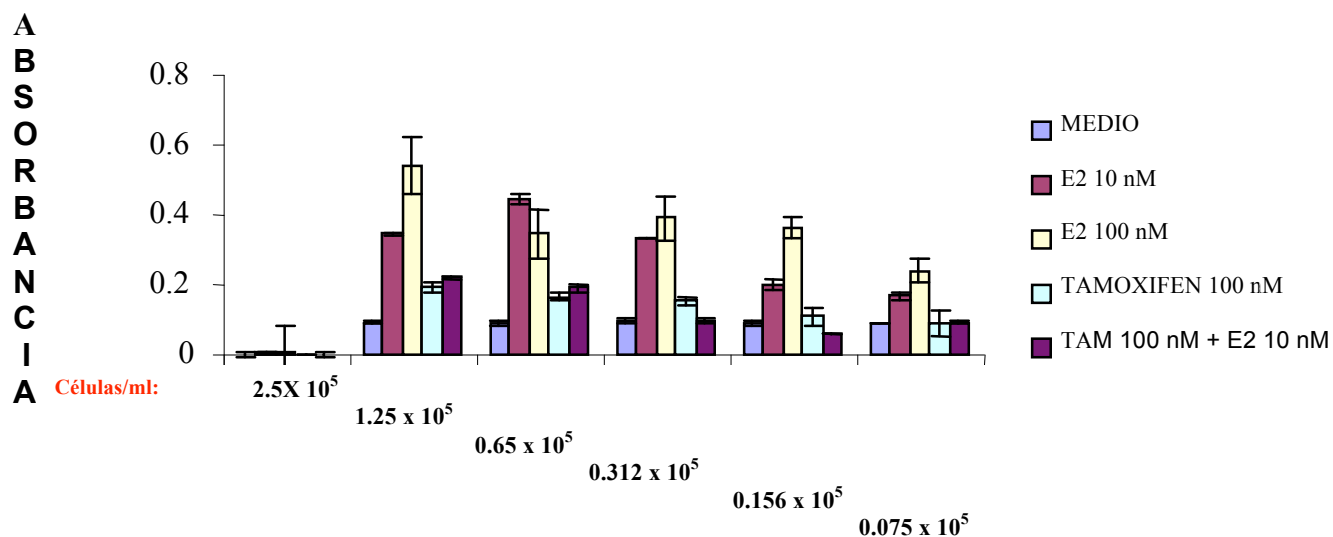


Figura 15. Estandarización del ensayo de proliferación celular a través del método de MTT. Los tratamientos son mostrados en la parte izquierda. Los datos son presentados por triplicado. Se muestra error estándar.

El resultado obtenido indica que, como se esperaba, los tratamientos con 10 nM y 100 nM de E2 aumentan la proliferación en estas células. Conforme se diluyeron las células, se puede hacer una comparación mas precisa del comportamiento celular bajo los tratamientos. A partir de la dilución 1.25x10⁵ hasta la ultima dilución 0.075x10⁵ se observa un aumento en la proliferación celular como era de esperarse con los tratamientos utilizados cuando es incubada las células con las dos dosis de E2; si lo comparamos con el tratamiento con Tamoxifén 100 nM, que en capítulos anteriores se hizo referencia su aplicación en la clínica y su modo de acción biológica, observamos el comportamiento contrario para todo los casos, la proliferación se encuentra muy disminuida. Cuando se combinan tamoxifén y E2 también

se presenta una disminución en el crecimiento celular como se observa en los tratamientos representados con la barra morada y que es muy evidente en las concentraciones 1.25×10^5 , 0.65×10^5 , 0.312×10^5 , 0.159×10^5 , 0.075×10^5 células/pozo, lo que indica que tamoxifén es capaz de competir con E2 por el receptor de estrógenos e inhibir su efecto proliferativo como ya se ha documentado (Moy B. y cols., 2006).

Habiendo estandarizado el ensayo, se probó el efecto biológico de nuestra proteína híbrida en la línea celular derivada de cáncer de mama, MCF-7, la cual expresa al receptor de estrógenos. Se ha reportado previamente que las células MCF-7 presentan un posible receptor específico para AFP que media la actividad antiproliferativa de AFP en esta línea celular. Es importante mencionar que, como se ha descrito previamente, la AFP humana no une E2 bajo condiciones fisiológicas (Uversky VN y cols., 1995; Uversky VN y cols., 1997), sin embargo es necesario crear un cambio conformacional en la molécula recombinante que le permita interactuar con su receptor y para ello se puede preincubar con concentraciones altas de E2 (100 nM). Esta preincubación, no debe afectar directamente la unión de E2 a su receptor ya que, por las altas concentraciones de E2 utilizadas para la preincubación, esperamos que la AFP ya se encuentre saturada y no logre secuestrar el E2 que se utiliza para inducir la proliferación en esta línea celular. Para comprobar esto, se realizaron ensayos sin preincubar a la AFP con E2, y se observó que no había efecto sobre la proliferación inducida por E2 en células MCF-7.

Se realizó el ensayo de proliferación para determinar si las construcciones híbridas que realizamos presentan el mismo efecto biológico que la forma nativa de AFP. Así, como primer paso probamos la construcción GFP-AFP que obtuvimos en mayor cantidad que AFP-GFP bajo las siguientes condiciones.

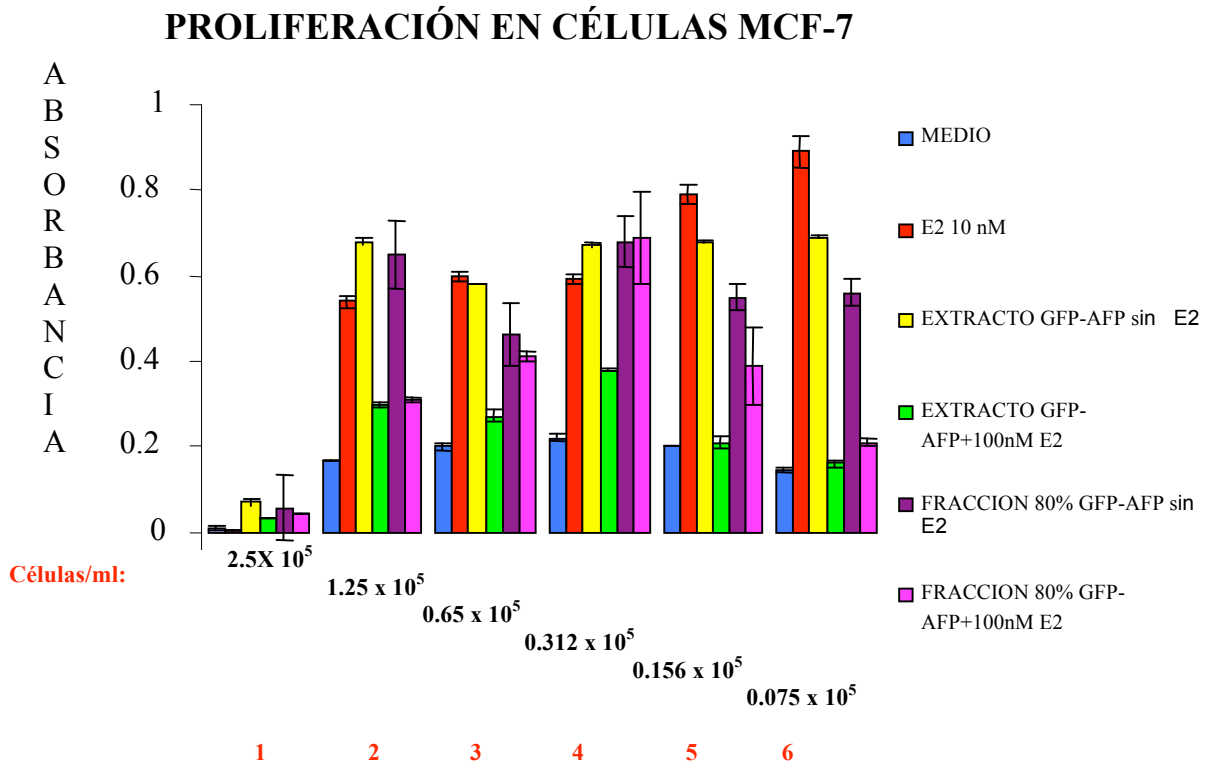


Figura 16. Proliferación de células MCF-7. Se determinó la proliferación celular inducida por E2, por el método de MTT sometidas a la incubación con la construcción de GFP-AFP en presencia o ausencia de una

preincubación (dos horas) con 100 nM E2 bajo las siguientes condiciones de cultivo: Columna ■ (azul) control, medio de cultivo solo con SFB al 0.2%; Columna ■ (rojo) células incubadas con 10 nM de E2; Columna ■ (amarilla) células incubadas 10 nM de E2 y con 15 µg/ml de extracto total de GFP-AFP sin previa incubación de E2; Columna ■ (verde) células incubadas con 10 nM E2 mas extracto total de GFP-AFP con previa incubación de E2 (100 nM); Columna ■ (morado) células incubadas con 10 mM E2 y 1.5 µg/ml fracción 80% GFP-AFP sin incubación previa de E2; Columna ■ (rosa) células incubadas con 10 mM E2 y 1.5 µg/ml fracción 80% GFP-AFP + 100 nM E2. Diluciones celulares: 1) 2.5×10^5 ; 2) 1.25×10^5 ; 3) 0.625×10^5 ; 4) 0.312×10^5 ; 5) 0.156×10^5 y 6) 0.075×10^5 . Todos los experimentos fueron realizados por triplicado. Se muestran error estándar. La gráfica es un experimento representativo realizado por triplicado se repitió en tres ocasiones el mismo experimento bajo las mismas condiciones.

Como indica la figura 16, la incubación con la proteína GFP-AFP, al parecer disminuye la proliferación celular solo cuando esta es preincubada con 100 nM de estradiol, sin embargo cuando no se realiza una incubación previa con estradiol no disminuye la proliferación celular. Los datos apoyan los resultados previos del trabajo de Bennet JA. y cols., 2002. Este efecto podría ser debido a que, como ya ha sido previamente descrito (Mizejewski GJ, cols., 1985; Mizejewski GJ, y cols., 1997; Mizejewski GJ y cols., 1996; Mizejewski GJ y cols., 1983), el estradiol en concentraciones altas permite un cambio conformacional en la molécula de AFP que facilita su interacción con su receptor y de esta manera logra inducir alguna respuesta que media su efecto de inhibidor de la proliferación en la línea celular MCF-7. Además cabe aclarar que en los trabajos previos de Bannet JA y cols. 2002; Mijzejewki GJ. Y cols. 1983, 1996, 1997 y Villacampa JM y cols., 1984 se comparó el efecto antiproliferativo de la AFP nativa contra otras proteínas, por lo que durante este trabajo no fue necesario incluir la AFP nativa como parte de los controles.

Adicionalmente, como se observa en la figura 16, se probó si existe diferencia en la respuesta utilizando el extracto total de la construcción GFP-AFP o la fracción parcialmente purificada (fracción 80%). Los resultados indican que no hay mucha diferencia entre utilizar el extracto total o la fracción 80% de GFP-AFP, sin embargo nosotros pensamos que el extracto total puede contener componentes que pudieran afectar la acción biológica de AFP, por lo cual se decidió utilizar un método de separación parcial, eficiente y en grandes concentraciones como lo es el método de sulfato de amonio. Aunque no es una purificación absoluta, en los resultados demuestran que es suficiente para obtener un funcionamiento adecuado de la AFP. Adicionalmente, se estudiaron los efectos de la proteína híbrida invertida, AFP-GFP que se purificó a partir del sobrenadante de las células transfectadas.

PROLIFERACIÓN EN CÉLULAS MCF-7

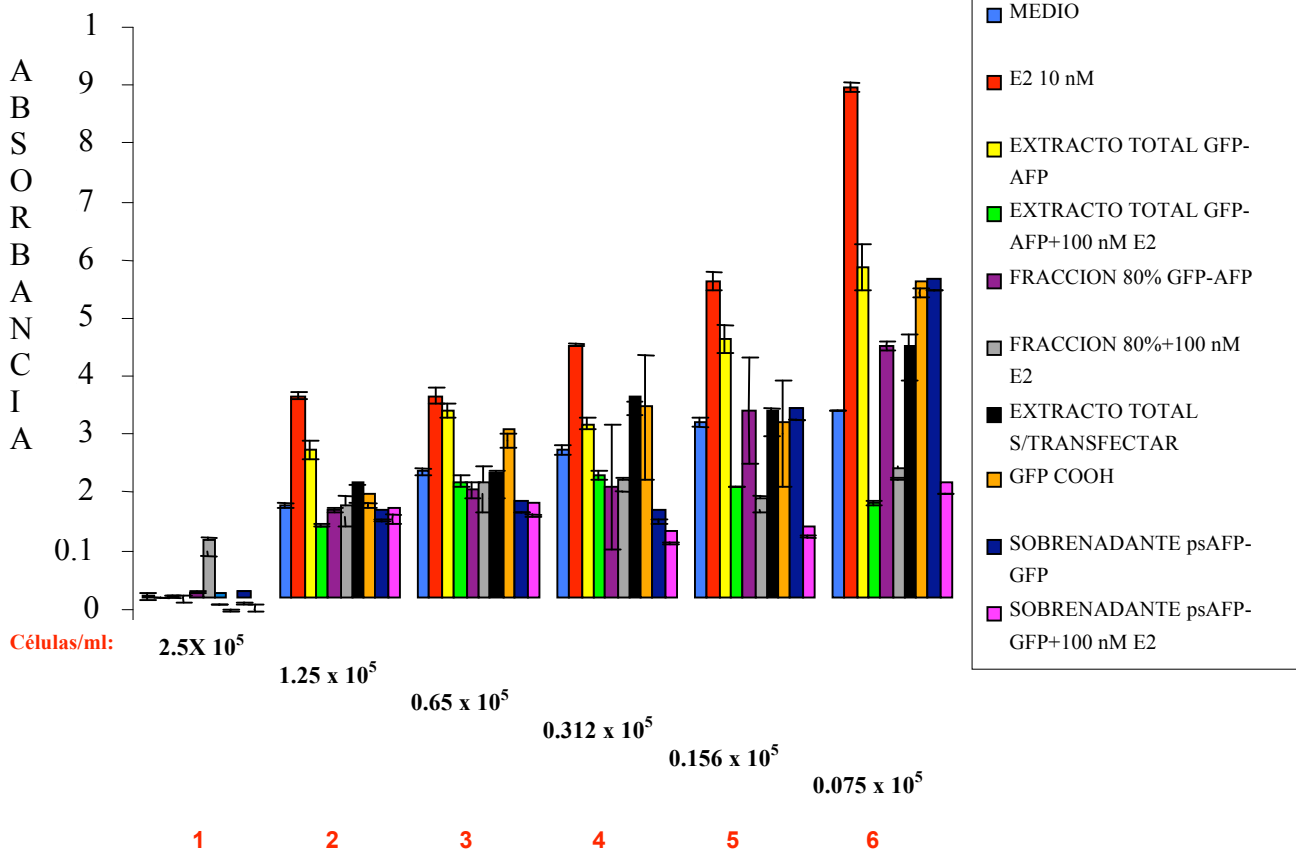


Figura 17. Proliferación de células MCF-7 (2). Se determinó la proliferación celular inducida por E2, por el método de MTT sometidas a la incubación con las construcciones GFP-AFP, psAFP-GFP con previa incubación (dos horas) con 100 nM E2 y sin incubación previa con E2, para todos los casos se incubó con 10 nM de E2. bajo las siguientes condiciones de cultivo: Columna **■** (azul) control, medio de cultivo solo con SFB al 0.2%; Columna **■** (rojo) células incubadas con 10 nM de E2; Columna **■** (amarillo) incubadas con 15 µg/ml de extracto total de GFP-AFP+ E2 sin previa incubación de E2; Columna **■** (verde) extracto total + previa incubación de E2 (100 nM); Columna **■** (morado) 1.5 µg/ml fracción GFP-AFP sin incubación previa de E2; Columna **■** (gris) 1.5 µg/ml fracción 80% GFP-AFP + previa incubación de 100 nM E2; Columna **■** (negro) Extracto total sin transfectar Columna **■** (naranja) extracto total de células transfectadas con GFP COOH (carboxilo); Columna **■** (azul marino) sobrenadante psAFP-GFP sin previa incubación de E2; Columna **■** (rosa) sobrenadante psAFP-GFP + previa incubación de 100 nM E2 (nota: la AFP fue incubada previamente 2 horas con E2 antes de iniciar el experimento). Diluciones celulares: 1) 2.5 x 10⁵. 2) 1.25 x 10⁵; 3) 0.625 x 10⁵; 4) 0.312 x 10⁵; 5) 0.156 x 10⁵; 6) 0.075 x 10⁵. Se muestran error estándar. La gráfica es un experimento representativo realizado por triplicado se repitió tres ocasiones el mismo experimento bajo las mismas condiciones.

Como se muestra en la figura 17, tanto las fracciones utilizadas como los extractos totales tienen un efecto directo en la disminución del crecimiento celular a diferentes diluciones de células MCF-7, aunque en la dilución 0.312x10⁵, 0.156x10⁵ y 0.074x10⁵ es más evidente este comportamiento. Adicionalmente, los resultados muestran que no hay grandes diferencias entre la GFP-AFP y la psAFP-GFP, lo cual sugiere que la fusión de la GFP en el extremo carboxilo terminal no está interfiriendo con la interacción de AFP con su receptor. Además se probó la fracción 80% psAFP-GFP sin embargo, su purificación fue menos eficiente que la de la construcción GFP-AFP por lo que se probó una sola vez y se encontró que también

inhibe la proliferación celular de manera similar al extracto total cuando es incubada previamente con E2.

Estos datos confirman el efecto antiproliferativo que tiene la AFP, cuando es activada por ligando, sobre la proliferación inducida por E2 en células MCF-7. Por lo tanto en estos experimentos de proliferación podemos concluir que en ausencia de preincubación con un ligando, se ve disminuido el efecto inhibitorio de la AFP, lo cual demuestra que el cambio conformacional es necesario para que la proteína se una eficientemente a su receptor y lleve a cabo sus efectos fisiológicos. Adicionalmente, nos indica que el efecto de la AFP no es por el secuestro del E2 en el medio de cultivo.

4. EFECTO DE AFP SOBRE LA ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL DEL RE.

El siguiente experimento consistió en determinar si las construcciones GFP-AFP y psAFP-GFP afectan la actividad transcripcional del receptor de estrógenos en presencia y ausencia de estradiol en la línea celular MCF-7, que contiene un receptor de estrógenos endógeno y en la línea celular HeLa derivada de cáncer de cérvix que no expresa al receptor de estrógenos. La actividad transcripcional es mediada a través de un gen reportero controlado por un promotor inducible para el receptor de estrógenos en presencia de múltiples elementos de respuesta para este gen y posteriormente se normalizó midiendo la actividad de β -galactosidasa controlado por un promotor constitutivo. Se realizaron tratamientos con los extractos crudos de ambas proteínas de fusión y con las proteínas parcialmente purificadas. Se observó que en ambos casos, el tratamiento con AFP inhibe la actividad transcripcional del RE. Adicionalmente, se realizaron experimentos en células MCF-7 transfectando el vector de expresión para psAFP-GFP para asegurar que los efectos observados no pudieran ser mediados por otro factor dentro de los extractos, obteniendo los mismos resultados (Fig. 18 y 19).

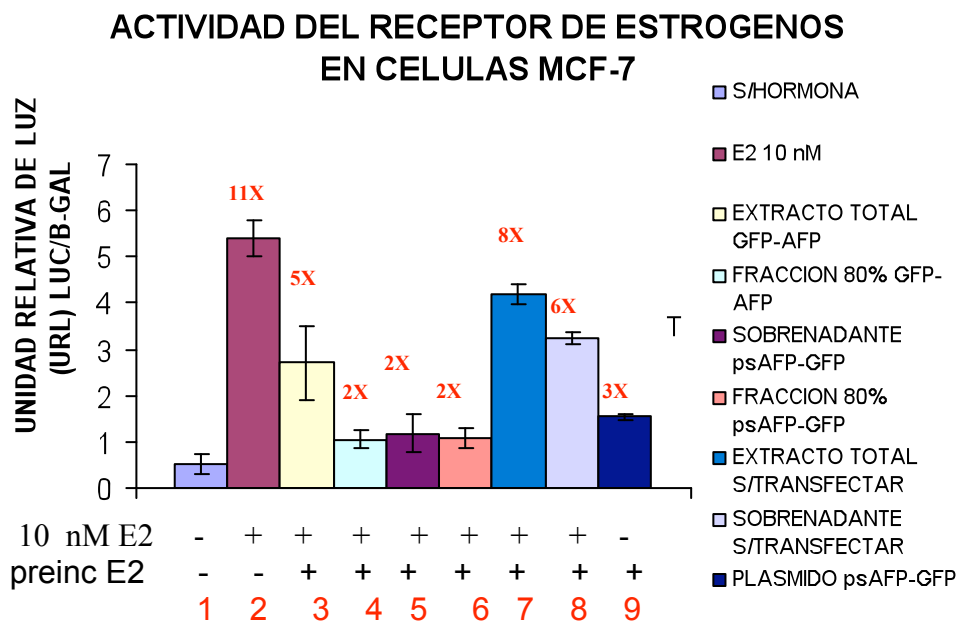


Figura 18. Actividad transcripcional del receptor de estrógenos en presencia y ausencia de GFP-AFP o AFP-GFP en células MCF-7. Se transfecaron células MCF-7 con los plásmidos el reportero 3XERE-Luc y pCMV- β -gal y se midió la actividad transcripcional en presencia y ausencia de 10 nM E2 bajo los siguientes tratamientos: 1) sin

80% GFP-AFP; 5) 10 nM E2 y 5 µg/µl de sobrenadante AFP-GFP; 6) 10 nM E2 y 1.5 µg/µl de la fracción 80% AFP-GFP; 7) 10 nM E2 y 15 µg/ml de un extracto total sin transfectar; 8) 10 nM E2 y 5 µg/µl de sobrenadante sin transfectar; 9) se transfectó con 1.5µg/µl plásmido pDEST53- psAFP-GFP. Como se indica en la gráfica en las columnas 3, 4, 5, 6, 7 y 8 los diferentes extractos se incubaron 2 horas con 100 nM E2 antes de ser añadidos a los pozos correspondientes, para el tratamiento de la columna 9 se adicionó 100 nM de E2 directamente al medio de cultivo para inducir el cambio conformacional de la proteína que es exportada hacia el exterior, por último para todo los casos a excepción del control sin hormona (columna 1) se añadió 10 nM de E2 a todos los tratamientos para inducir la actividad transcripcional del RE. Se incubó tanto con la proteína híbrida como en los demás tratamientos durante 3 horas antes de realizar el ensayo de luciferasa. Los números sobre las barras muestran la inducción de la actividad transcripcional comparado con el control en ausencia de hormona. Todos los experimentos fueron realizados por triplicado. Se muestran error estándar. La gráfica es un experimento representativo realizado por triplicado se repitió tres ocasiones el mismo experimento bajo las mismas condiciones.

Los resultados indican que la actividad transcripcional en presencia de E2 aumenta considerablemente comparado con el control en ausencia de E2 (11 veces mayor inducción). Sin embargo, cuando las células MCF-7 en presencia de E2 son incubadas con extracto total GFP-AFP (columna 3), fracción 80% GFP-AFP (columna 4), sobrenadante AFP-GFP (columna 5) o fracción 80% AFP-GFP (columna 6), disminuye la actividad transcripcional del receptor de estrógenos. Como controles negativos se utilizaron extractos celulares y sobrenadantes de células COS7 que no habían sido transfectadas con AFP (Fig. 18, columnas 7 y 8). Nuestros resultados demuestran que no hay efecto sobre la actividad transcripcional mediada por RE en presencia de E2, lo cual indica que es la AFP y no otra proteína, induce la inhibición de la actividad transcripcional. Finalmente, se cotransfectaron la células MCF-7 con psAFP-GFP y se incubaron las células con 100 nM E2 (Fig. 18, columna 9). Encontramos que existe una disminución en la actividad transcripcional mediada por RE. Pensamos que este efecto se debe a que la AFP-GFP, al ser transportada hacia el exterior celular en presencia de altas concentraciones de E2, logró obtener el cambio conformacional necesario para unirse a su posible receptor y logró inhibir la actividad transcripcional de RE. Estos resultados apoyan datos anteriores que el mecanismo antiproliferativo de AFP en estas células se realiza de manera que modifica la actividad transcripcional de RE.

A continuación se probó la línea celular HeLa que no presenta receptor de estrógenos endógeno, así que se transfectó el REa, y se utilizaron los mismos tratamientos.

ACTIVIDAD DEL RECEPTOR DE ESTRÓGENO EN CÉLULAS HeLa

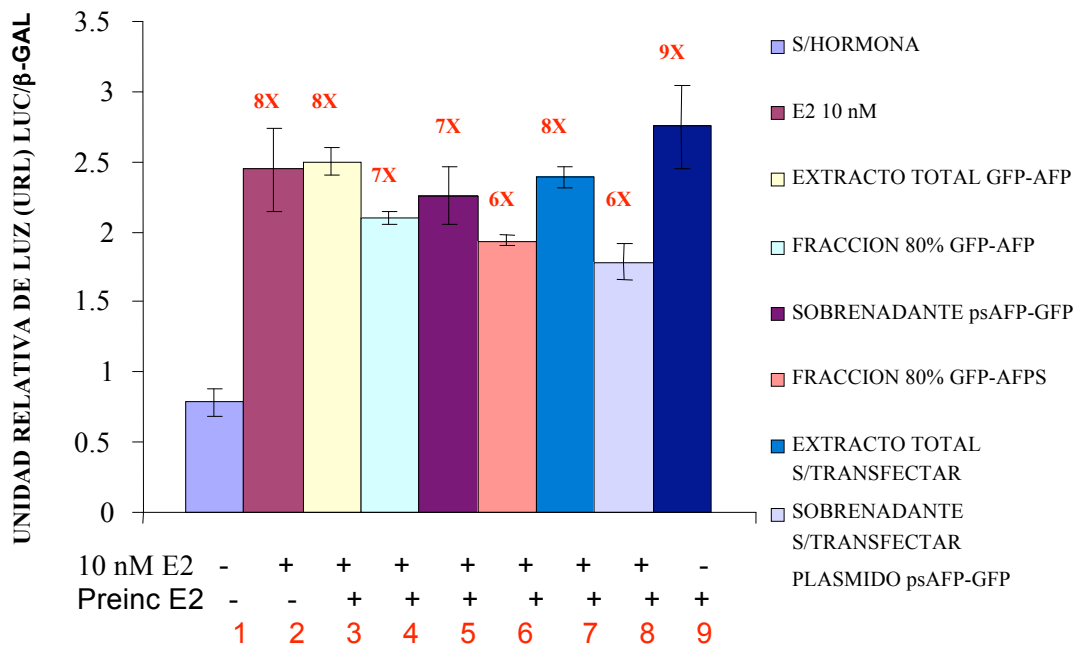


Figura 19. Actividad transcripcional del receptor de estrógenos en presencia y ausencia de GFP-AFP o AFP-GFP en células HeLa. Se transfectaron células HeLa con $RE\alpha$, el reportero 3xERE-Luc y pCMV- β -gal y se determinó la actividad de luciferasa en presencia y ausencia de 10 nM E2 bajo los siguientes tratamientos: 1) sin hormona; 2) 10 nM E2; 3) 15 μ g/ml extracto total GFP-AFP; 4) 1.5 μ g/ml fracción 80% GFP-AFP; 5) 5 μ g/ μ l de sobrenadante AFP-GFP; 6) 1.5 μ g/ μ l de la fracción 80% AFP-GFP; 7) 15 μ g/ml de un extracto total sin transfectar; 8) 5 μ g/ μ l de un sobrenadante sin transfectar; 9) se transfectó con 1.5 μ g/ μ l plásmido pDEST53-psAFP-GFP. Como se indica en la gráfica, en las columnas 3, 4, 5, 6, 7 y 8 se incubaron los extractos proteicos 2 horas con 100 nM de E2 antes de ser añadidos a los pozos correspondientes. Para el tratamiento de la columna 9 se adicionó 100 nM de E2 directamente al medio de cultivo para inducir el cambio conformacional de la proteína que es exportada hacia el exterior. Por último, para todos los casos, a excepción del control sin hormona (columna 1), se añadió 10 nM de E2 para inducir la actividad transcripcional del RE. Las incubaciones con E2, tanto como con la proteína híbrida se realizaron durante 3 horas antes de realizar el ensayo de luciferasa. Todos los experimentos fueron realizados por triplicado. Se muestran error estándar. La gráfica es un experimento representativo realizado por triplicado. Se repitió tres ocasiones el mismo experimento bajo las mismas condiciones.

Los resultados son claros ya que ninguno de los tratamientos afectó la actividad transcripcional de $RE\alpha$ en las células HeLa. Esto sugiere que las células HeLa no tienen el mecanismo que es requerido para observar efectos mediados por AFP y probablemente no expresan el posible receptor para AFP lo cual evitaría que se encienda la vía de señalización requerida para afectar la actividad del receptor de estrógenos. La modulación del receptor de estrógenos parece ser crucial para llevar a cabo el efecto antiproliferativo de AFP y adicionalmente depende de la presencia de un receptor específico para AFP.

Como se ha mencionado previamente, estamos en la búsqueda de una línea celular que no presente receptor para AFP, como parte de una segunda fase experimental que tiene como objetivo la clonación del receptor para AFP, por lo que la línea celular HeLa es un buen candidato para tales fines. Adicionalmente, se estudió la posibilidad de encontrar otras líneas celulares que no presenten receptor para AFP.

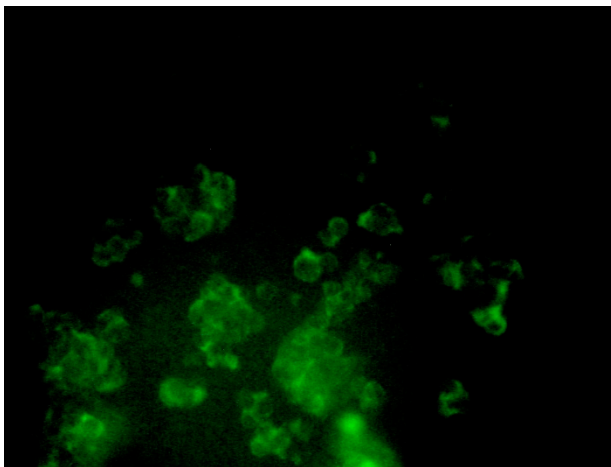
5. INTERACCIÓN DE AFP CON SU RECEPTOR (ANÁLISIS CITOMETRÍA DE FLUJO).

Así, el siguiente experimento consistió en determinar si las proteínas híbridas, tanto la fracción 80% GFP-AFP como el extracto total de GFP-AFP, son capaces de interactuar con células de diferente origen celular y si esta interacción permite endocitar nuestra proteína. La presencia de GFP nos permitió monitorear a nuestra proteína a través de la observación en microscopio de fluorescencia cuando son preincubadas con E2. Observamos que al añadir la fracción 80% GFP-AFP o el extracto total, preincubados durante 2 h con 100 nM E2, a células MCF-7 se muestra fluorescencia tanto en la membrana como al interior de las células al ser observadas en el microscopio de fluorescencia. Esto implica un reconocimiento por un receptor de membrana que ayuda a endocitar a la proteína híbrida. Adicionalmente, se realizó el experimento utilizando una variedad de líneas celulares como LNCaP, COS-7, HepG2 y HeLa (datos no mostrados) para revisar si estas células eran capaces de mantener a nuestra proteína híbrida. Nuestros resultados mostraron que, a excepción de la línea celular HepG2, las demás líneas celulares estudiadas no mostraron fluorescencia.

LÍNEA CELULAR	ORIGEN
LNCaP	Adenocarcinoma de Próstata
Cos-7	Riñón de Mono Verde
HepG2	Hepatocarcinoma Humano
HeLa	Cáncer Cérvico-Uterino
CV-1	Riñón de Mono Verde
MCF-7	Carcinoma Ductal de Mama

Tabla 2. Líneas Celulares.

Fracción 80 GFP-AFP



Extracto total GFP-AFP

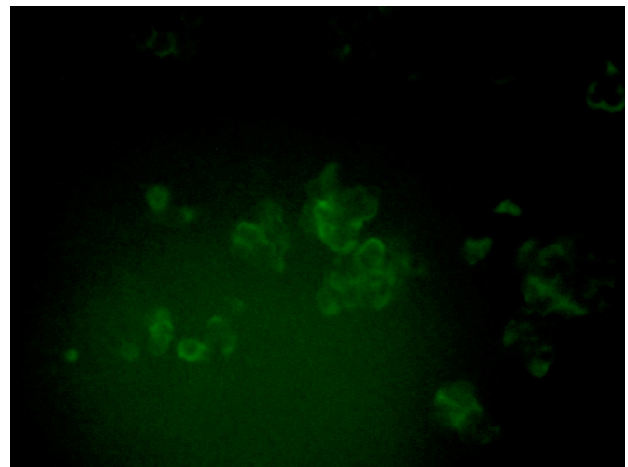
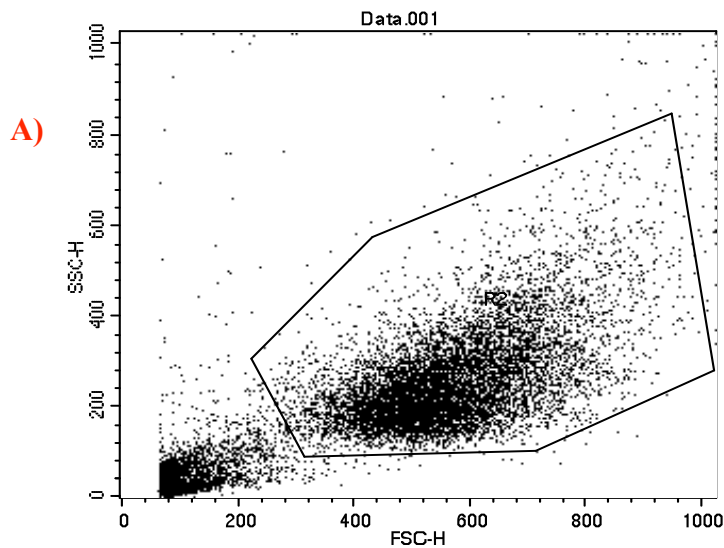


Figura 20. Visualización por microscopía de fluorescencia de GFP-AFP en células MCF-7. Se incubaron las células MCF-7 con 1.5 µg/µl de fracción 80 de GFP-AFP o 15 µg/ml de extracto total de GFP-AFP preincubadas dos horas E2 100nM y se dejó incubar por espacio de una hora en células MCF-7, se visualizo por microscopia fluorescente.

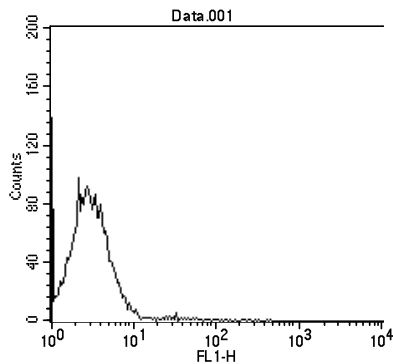
Como se muestra en la figura 20, ambas fracciones son capaces de interactuar con las células MCF-7. Adicionalmente, la figura muestra fluorescencia al interior de las células lo que indica que las proteínas fueron capaces de endocitarse. Así, como pregunta final se decidió un nuevo ensayo que asegurara si existía especificidad de ambas construcciones y encontrar una línea celular que no presente receptor de AFP y pueda ser utilizada para la siguiente fase experimental.

Decidimos utilizar en este experimento solo la fracción 80% GFP-AFP que ha demostrado tener efecto antiproliferativo en la línea celular MCF-7 e inhibe la activación transcripcional del RE. Decidimos utilizar citometría de flujo para demostrar unión de la GFP-AFP por su receptor en células MCF-7 y decidimos comparar el efecto de esta proteína en diferentes líneas celulares como LNCaP, HeLa, COS-7, CV-1, MCF-7, HepG2. Estos experimentos se realizan para observar si existe interacción e internalización en otras líneas celulares

A continuación se muestran algunos de los resultados:

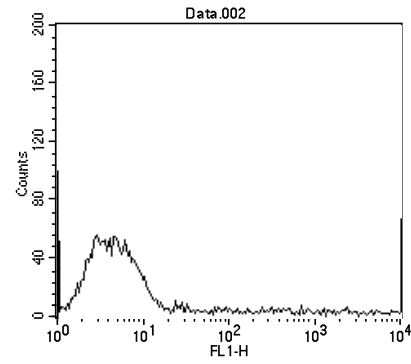


MCF-7



1)

MCF-7



2)

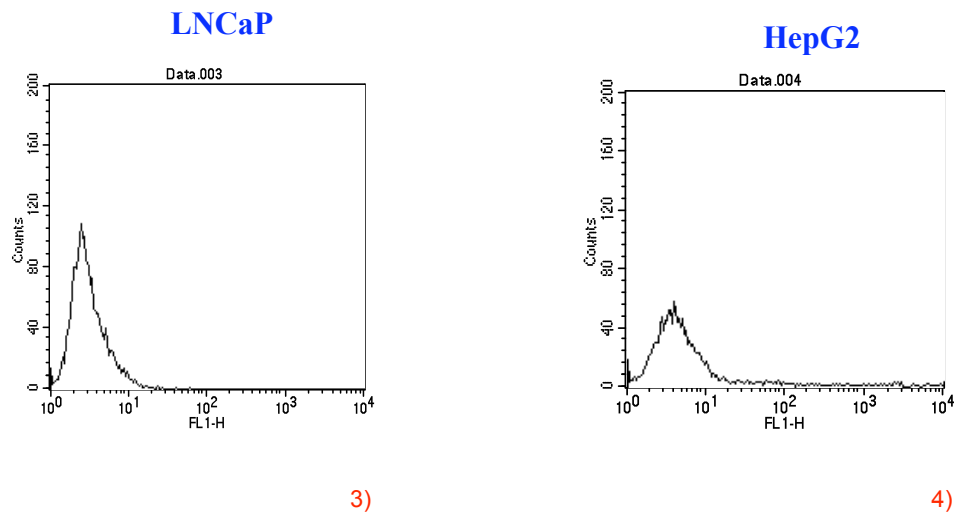


Figura 21. Análisis de citometría de flujo (FACScan) de células MCF-7, LNCaP y HepG2 incubadas con GFP-AFP. A) Blot de células tomadas para análisis. 1) Células MCF-7 incubadas con E2; 2) Células MCF-7 incubadas con 1.5 $\mu\text{g/ml}$ fracción 80% GFP-AFP + E2; 3) Células LNCaP incubadas con 1.5 $\mu\text{g/ml}$ fracción 80% GFP-AFP + E2; 4) Células HepG2 incubadas con 1.5 $\mu\text{g/ml}$ fracción 80% GFP-AFP + E2. Se incubó la proteína con E2 100 nM durante 2 horas previas a la incubación con las líneas celulares.

Los resultados indican que la fracción 80% de GFP-AFP tuvo afinidad por la línea celular MCF-7 (Figura 21 panel 2) así como por la línea HepG2 (panel 4) que previamente está documentado presentan un receptor para AFP. En el caso de la línea celular LNCaP, se encontró escasa fluorescencia, por lo que en esta línea celular se puede asegurar no presenta un receptor para AFP (panel 3). Adicionalmente al resultado obtenido con las células LNCaP, se probaron las líneas celulares COS-7, HeLa, y CV-1 donde no se encontró unión de la fracción 80% GFP-AFP a ninguna de estas líneas.

Las poblaciones celulares, para el caso de la población de la línea MCF-7, son mostradas en el panel A como ejemplo de cómo fueron utilizadas las demás líneas celulares para estos ensayos de reconocimiento. Los resultados fueron comparados contra sus controles (panel 1).

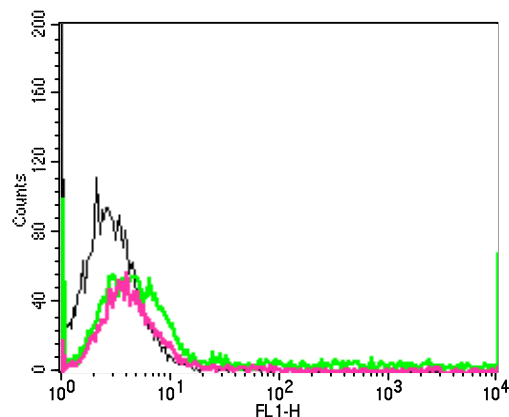


Figura 22. Citometría de células MCF-7 incubadas con GFP-AFP en presencia y ausencia de una preincubación con E2 100 nM. Se incubaron células MCF-7 con 1.5 $\mu\text{g/ml}$ de fracción 80% GFP-AFP (línea negra) sin E2; con 1.5 $\mu\text{g/ml}$ fracción 80% GFP-AFP + E2 (línea verde); Incubación extracto total GFP-AFP+E2 (línea rosa). En todos los casos llevo a cabo la incubación durante dos horas.

La figura 22 muestra la fluorescencia incorporada cuando la GFP-AFP es sometida a incubación previa con E2 y en ausencia de la hormona. Observamos un desplazamiento en la señal fluorescente cuando la línea celular es incubada con la construcción GFP-AFP previa a la incubación con E2. Ha sido documentado en experimentos previos (Villalpando y cols 2004), que AFP requiere ser expuesto a algún ligando para interactuar con su receptor, en este caso, a altas concentraciones de E2 como fue confirmada durante este trabajo experimental. Así, pensamos que las construcciones realizadas durante esta primera etapa experimental expresan proteínas de fusión capaces de reconocer a un receptor específico en la línea celular derivada de cáncer de mama MCF-7, así como en la línea celular HepG2. Los mecanismos específicos que se presentan durante la modulación de AFP en células positivas para RE se mantienen sin ser resueltas, sin embargo esta herramienta que se ha comprobado durante esta etapa experimental nos permitirá proponer una estrategia experimental que permita clonar al receptor de AFP como parte de un siguiente trabajo experimental.

DISCUSIÓN

Se ha mencionado que alfa-fetoproteína y algunos péptidos sintéticos derivados de su región carboxilo terminal son potentes factores antiestrogénicos con potencial para utilizarse como una nueva clase de agentes terapéuticos contra cáncer de mama. Sin embargo, se conoce muy poco sobre los mecanismos que se regulan por esta proteína, ya que se desconoce su receptor y las vías de señalización que pudiera activar. Durante este proyecto se evaluó el efecto biológico de una proteína de fusión de AFP con GFP para ver su eficacia como una herramienta crítica para la clonación y caracterización del receptor de AFP.

Así, como primer objetivo de este proyecto el gen de AFP fue clonado de manera que se obtuviera un gen fusionado con GFP en el extremo amino ó carboxilo terminal, para determinar cuál configuración permite una mejor unión al receptor. Adicionalmente, se mantuvo el péptido señal de AFP en la construcción donde GFP se encontraba en el extremo carboxilo (psAFP-GFP). Esto permitió que la proteína se transportara al exterior de las células y se pudiera purificar a partir del sobrenadante del cultivo celular.

La eficiencia de purificación de las proteínas híbridas expresadas en células COS-7 transfectadas transitoriamente, ya sea a partir de extractos celulares totales, en el caso de GFP-AFP o a partir de sobrenadantes, en el caso de psAFP-GFP fue muy similar para las dos construcciones. Adicionalmente, en ambos casos se encontró que una precipitación con 80% de sulfato de amonio daba un nivel razonable de purificación. En general, se obtuvo una mayor concentración de la proteína híbrida GFP-AFP que de AFP-GFP obtenida del sobrenadante celular. Sin embargo, al concentrar el sobrenadante por diálisis, se comenzó con un extracto más puro que contiene menos proteínas pequeñas, las cuales no son de nuestro interés.

AFP presenta tres dominios. Entre los dominios I y III AFP presenta una región de bisagra la cual le permite adoptar una forma flexible que, cuando es expuesta a un ligando, como son los ácidos grasos o en este caso un exceso molar de E2, se provoca un cambio conformacional en la molécula de AFP llevándola a exponer sitios de reconocimiento que facilitan su unión a su receptor ((Mizejewski GJ. Y cols 1995). Adicionalmente, se ha documentado que aunque AFP de roedor es capaz de unir a E2 y transportarlo, la AFP humana no transporta E2 lo cual sugiere que la afinidad por este ligando es muy baja y se requieren de altas concentraciones para que se realice este cambio conformacional. En base a estos hechos, utilizamos un exceso molar de E2 para cambiar la estructura conformacional de nuestras proteínas híbridas y determinar si demostraban los mismos efectos biológicos que se han reportado para la proteína nativa. Así, se realizaron una variedad de experimentos que incluyeron determinar su actividad sobre la proliferación de células MCF-7, la actividad transcripcional del receptor de estrógenos, la internalización de AFP en líneas celulares que expresan el receptor putativo de AFP y la determinación de algunas líneas celulares que no internalicen a la AFP, lo cual indicaría que no expresan al receptor de AFP.

Inicialmente estudiamos los efectos de las proteínas GFP-AFP y psAFP-GFP sobre la proliferación estrógeno-inducida de células MCF-7. Los resultados mostraron que ambas proteínas inhibieron la proliferación de células MCF-7 de manera similar (figura 17). Estos resultados fueron observados al ser preincubadas con un exceso molar de E2, sin embargo no se presentó dicho comportamiento en ausencia de una preincubación. Esto indica que, al igual que ocurre con la proteína nativa, se requiere de un cambio conformacional en estas moléculas para que lleven a cabo su actividad. Adicionalmente, esto indica que el mecanismo mediante el cual actúa la AFP no es debido a que pueda depletar al E2 del medio y así evitar la proliferación celular, ya que en ausencia de una preincubación de la AFP con un exceso

molar de E2, la proliferación es similar a la observada en ausencia de AFP. Por otra parte, el utilizar extractos totales o fracciones parcialmente purificadas que contienen la proteína híbrida nos dieron resultados muy similares. Esto sugiere que la interacción de AFP con su receptor es específica y que no hay proteínas adicionales en el medio que puedan competir con AFP o bloquear su efecto. Por otra parte, al utilizar un extracto total de células sin transfectar o extracto de células transfectadas con GFP solo, no cambia la proliferación celular de las células MCF-7 comparadas con el control, mostrando que el efecto antiproliferativo es mediado por AFP (figuras 16 y 17). De esta forma se confirmó que ambas proteínas de fusión de AFP muestran un efecto antiproliferativo y que la fusión de la proteína con GFP no afecta, su efecto biológico. Esto indica que las construcciones realizadas pueden ser una poderosa herramienta para comprender mejor como se lleva a cabo dicha acción biológica y que componentes celulares están participando para tal efecto.

Utilizamos ensayos de activación transcripcional, a través de un gen reportero de luciferasa dependiente de RE, para determinar si nuestras proteínas híbridas eran capaces de inhibir la transactivación mediada por REa en presencia de estradiol. Nuestros resultados demuestran que tanto psAFP-GFP como GFP-AFP son capaces de inhibir la actividad transcripcional de REa en células MCF-7. Sin embargo, al repetir los experimentos en células HeLa con el REa transfectado transitoriamente, observamos que ninguna de nuestras proteínas fue capaz de inhibir la activación transcripcional. Esto sugiere que no solo es necesaria la presencia de REa, sino que las células HeLa no presentan un receptor de AFP que medie esta actividad. (Figuras 18 y 19). Esto se confirmó utilizando ensayos de citometría de flujo, los cuales indicaron que estas células no internalizan a la AFP.

Inicialmente, se confirmaron los efectos antiproliferativos que le han sido atribuidos a AFP en células de cáncer de mama, MCF-7 (Goncharova O. y cols., 1999). Como se mencionó anteriormente, la actividad antiestrogénica de la AFP y sus péptidos derivados, está restringida a células que contienen receptores de estrógenos in vivo e in vitro (Villacampa JM y cols., 1984). El efecto observado durante los experimentos de proliferación se explica por un mecanismo que involucra la regulación de la actividad del receptor de estrógenos. Bennet y cols., 2002 demostraron que AFP es capaz de inhibir el crecimiento de líneas celulares cancerosas que son resistentes a tamoxifén, indicando que este mecanismo no involucra una competencia directa por el receptor de estrógenos. Aun cuando no han sido descritos los mecanismos específicos de su actividad biológica, se especula que modula la respuesta de RE, mediante la activación de alguna vía de transducción de señales, desde la membrana celular siendo un posible blanco en este mecanismo la MAP cinasa (Pietras RJ, y cols., 1995; Krupnick JG, y cols., 1997; Tremblay A, y cols., 1999; Levin ER, y cols., 1999; Lee y cols., 2000; Campbell y cols., 2001), que es conocida modula un gran número de procesos biológicos. Sin embargo, son pocos los trabajos conocidos que apoyan dicha posibilidad. Así, puesto que AFP es capaz de interactuar con componentes de la membrana celular (Villacampa y cols., 1999), pensamos que dicho proceso es mediado por un receptor específico para AFP o por alguno ya descrito para algún otro ligando. Así que de acuerdo a las evidencias, es conocido que diferentes factores de crecimiento están participando de forma importante en la evolución de la masa tumoral como el EGFR (Pietras RJ, y cols., 1995; Krupnick JG, y cols., 1997; Levin ER, y cols., 1999; Lee y cols., 2000; Campbell y cols., 2001; Schiff R, y cols., 2005) y el HER-2/neu (Osborne CK, y cols., 2005) que ha sido ampliamente estudiado y se sabe es un receptor presente durante el desarrollo del cáncer de mama y es un importante blanco terapéutico utilizado en la clínica, sin embargo se requieren más estudios al respecto para poder proponer a estos receptores como posibles blanco de AFP.

La importancia de comprender los mecanismos por los que AFP realiza su función biológica tiene como meta el poder utilizarla en la clínica en cánceres de mama que son

refractarios a tamoxifén reduciendo los efectos secundarios que producen varios agentes que son utilizados en la actualidad en la clínica.

Aunque el receptor putativo no ha sido aislado e identificado, evidencias indirectas suponen la presencia de un receptor para AFP en las líneas celulares MCF-7, HepG2, linfocitos T y mioblastos (Dudich y cols., 1998). Como se mencionó anteriormente, la existencia de un posible receptor está estrechamente conectada a través de la unión preferencial de ácidos grasos insaturados sobre ácidos grasos saturados a AFP activando una vía endocítica saturada mediada por la proteína. El proceso de internalización envuelve endocitosis mediada por clatrina con localización en endosoma, en la red de trans Golgi o en cuerpos multivesiculares. Por lo tanto, AFP es un esencial mediador de la internalización celular de ácidos grasos no saturados a través de un receptor no identificado que podría ser específico para AFP. Otros trabajos que se mencionaron previamente y que apoyan la existencia de un receptor específico para AFP fueron realizados utilizando AFP marcada (Villacampa y cols. 1984), donde identificaron un receptor putativo para AFP en la línea celular MCF-7 de cáncer de mama. Este trabajo claramente indica que AFP es internalizada a través de un receptor (Villacampa y cols., 1984). Además otros grupos han desarrollado anticuerpos monoclonales contra el receptor MABS 167H.1 y 167H.4. Estos anticuerpos antagonizan el receptor de AFP llevando a la internalización del anticuerpo.

En este estudio, se confirmó la presencia de un receptor específico en las líneas celulares MCF-7 y HepG2, utilizando citometría de flujo y microscopía de fluorescencia para observar la internalización de nuestras proteínas híbridas. Adicionalmente, estas técnicas fueron utilizadas para encontrar alguna línea celular que no presente un receptor para AFP. En este caso, observamos que tanto la línea celular HeLa como COS-7 y LNCaP no internalizan nuestras proteínas fluorescentes y pudieran ser buenos candidatos para utilizarse en una segunda fase que tendrá como objetivo la clonación del receptor de AFP.

Estos son datos preliminares de la función de AFP como moduladora del crecimiento en líneas celulares de cáncer de mama, sin embargo todavía existen varias interrogantes sobre el mecanismo que utiliza AFP para llevar a cabo su actividad anticancerígena. Nosotros proponemos que en base a estos resultados, estas proteínas híbridas pueden ser utilizadas para nuevos ensayos que sean dirigidos a determinar el tipo de receptor por el cual AFP realiza su función biológica.

Nosotros proponemos utilizar líneas celulares negativas al receptor de AFP con una genoteca de expresión creada a partir de RNAm de células HepG2 sensibles a AFP. Esta genoteca es producida usando un kit de cDNA de Clontech (Palo alto, CA) que contiene genes resistentes a puromicina para su selección en células de mamíferos. El sistema asegura que todas las células que sobrevivan expresen un inserto de cDNA y así se reduzca la necesidad de purificación. Las células negativas al receptor para AFP serán transfectadas con dicha genoteca. A partir de los resultados expuestos anteriormente, proponemos utilizar células HeLa para estos experimentos. Las células que internalicen el ligando se podrán separar por citometría de flujo.

Así las clonas seleccionadas deberán ser purificadas y el inserto puede ser amplificado por PCR y secuenciado para determinar su identidad. Posteriormente, proponemos ensayos de caracterización del receptor de AFP verificando su unión así como también ensayos para la caracterización funcional. En este estudio proponemos determinar la afinidad de AFP por su receptor. Por lo que las construcciones realizadas nos permitirían utilizarlas para la determinación de la constante de afinidad como ha sido descrito anteriormente (Medina-Kauwe LK y cols., 2000). Adicionalmente, se podrían realizar ensayos de pérdida de expresión utilizando la técnica de RNA de interferencia en células que expresen el receptor de AFP endógeno para determinar la especificidad de estas interacciones. La técnica de RNA

de interferencia para silenciar proteínas de membrana de mamíferos se ha utilizado con mucho éxito para la caracterización de las mismas y para estudiar transporte intracelular (Ahn y cols 2003; Dhanvantari S. y cols., 2003; Gschwind A. y cols., 2003; Lou WJ. y cols., 2003; Siegmund D. y cols., 2002; Xu Y. y cols., 2002). Además para determinar el efecto del receptor de AFP sobre receptores de estrógenos en células de cáncer de mama proponemos realizar experimentos de proliferación y de actividad del receptor de estrógenos usando inhibidores específicos de cinasas de las vías de transducción de señales.

Recientemente, diferentes estudios en laboratorios alrededor del mundo han mostrado el uso del receptor de AFP (RECAF) como un posible biomarcador en diferentes cánceres. Se purificó el RECAF por inmunoensayos (realizando la purificación parcial del receptor de alfa-fetoproteína por cromatografía de afinidad). De acuerdo a los resultados la prueba inmunológica utilizando RECAF, logró distinguir pacientes en fase tempranas de cáncer de mama de individuos normales (Moro R, y cols., 2012). Tcherkassova J, y cols., 2011). Se comparó la utilidad terapéutica de RECAF contra biomarcadores utilizados en clínica como parte del panel en la detección de cáncer de mama, y cáncer de ovario, para esto determinaron por pruebas inmunológica los niveles de CEA (Antígeno carcinoembrionario) y del marcador para cáncer de ovario CA125, los resultados mostraron la superioridad de RECAF sobre los demás biomarcadores, por lo que se ha recomendado que se tome en cuenta como parte del panel que se utiliza en la actualidad en particular para la detección de la etapa temprana del cáncer de ovario.

Por lo tanto, identificar los componentes de la maquinaria celular envueltos en la acción de la AFP, así como el proponer una alternativa tecnológica para la búsqueda del receptor de AFP son las nuevas propuestas para la segunda fase experimental. La búsqueda del receptor de AFP implica un ambicioso proyecto de investigación que esperamos culmine con una utilidad de la molécula de AFP como un tratamiento eficaz en mujeres que han desarrollado cáncer de mama.

CONCLUSIONES

- * Las construcciones GFP-AFP y psAFP-GFP se pueden sobreexpresar y purificar parcialmente para ser utilizadas como herramientas para el estudio de la acción biológica de AFP. No es necesaria la purificación completa de estas proteínas para observar su actividad biológica
- * Las proteínas híbridas utilizadas durante este proyecto experimental ratificaron las observaciones previas donde AFP presenta una actividad antiproliferativa en línea celulares derivadas de cáncer de mama.
- * AFP bloquea la actividad transcripcional del receptor de estrógenos en células donde AFP logra ser internalizada.
- * Pensamos que AFP realiza su actividad antiproliferativa a través de regular al RE vía el bloqueo de alguna vía de señalización mediada por MAP cinasa.
- * AFP se une de forma específica a células derivadas de cáncer de mama MCF-7 y de Adenocarcinoma hepático HepG2.
- * Se encontró a las células LNCaP, HeLa y Cos-7 como posibles candidatos para la clonación del receptor para AFP ya que no internalizan a la AFP, indicando la ausencia de un receptor específico.

BIBLIOGRAFÍA

Abelev GI. Alpha-fetoprotein in association with malignant tumors. Nathan C, Xie QW, Halbwachs-Mecarelli L, Jin WW. Albumin inhibits neutrophil spreading and hydrogen peroxide release by blocking the shedding of DC43 (sialophorin, leukosialin). *J Cell Biol*; 122:243–256, 1993.

Akiyama T, Sudo C, Ogawara H, Toyoshima K, Yamamoto T. The product of the human c-erbB-2 gene: a 185-kilodalton glycoprotein with tyrosine kinase activity. *Science*; 232(4758):1644-6, 1986.

Allard D, Gilbert S, Lamontagne A, Hamel D, Belanger L. Identification of rat alpha-albumin and cDNA cloning of its human ortholog. *Gene*; 153:287–288, 1995.

Allen SH, Bennett JA, Mizejewski GJ, Andersen TT, Ferraris S, Jacobson HI. 1993 Purification of alpha-fetoprotein from human cord serum with demonstration of its antiestrogenic activity. *Biochim Biophys acta*;1202:135-42.

Allred DC, Clark GM, Molina R, Tandon AK, Schnitt SJ, Gilchrist KW, Osborne CK, Tormey DC, McGuire WL. Overexpression of HER-2/neu and its relationship with other prognostic factors change during the progression of in situ to invasive breast cancer. *Hum Pathol*; 23(9):974-979, 1992.

Anderson E. The role of oestrogen and progesterone receptors in human mammary development and tumorigenesis. *Breast Cancer Res*; 2002;4:197-201.

Andres OK, Dziadek M, Tamaoki T. Expression of methylation of the mouse alpha-fetoprotein gene in embryonic, adult, and neoplastic tissue. *J Biol Chem*; 257:5148–5153, 1982.

Aranda A y Pascual A. Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiological Reviews*; 81: 1269-1304, 2001.

Augereau P, Miralles F, Cavailles V, Gaudalet C, Parker M, Rochefort H. Characterization of the proximal estrogen-responsive element of human cathepsin D gene. *Mol Endocrinol*; 8:693–703,1994.

Beato M, Sánchez-Pacheco A. Interaction of steroid hormone with the transcription initiation complex. *Endoc Rev*; 17(6): 587-609. 1996.

Beato M and Klug J: Steroid hormone receptors: an update. *Human Reproduction Update*; 6(3):225-236 2000.

Beborowica J. Microheterogeneity of human alpha-fetoprotein. *Tumor Biol*; 9:3–14, 1988.

Bennett JA, Masfin FB, Andersen TT, Bierthy JF, Jacobson HI. A peptide derived from alpha-fetoprotein prevents the growth of estrogen-dependent human breast cancers sensitive and resistant to tamoxifen. *Proc Natl Acad Sci USA*; 99:2211-5, 2002.

Berwaer M, Martial JA, Davis JR. Characterization of an up-stream promoter directing extrapituitary expression of the human prolactin gene. *Mol Endocrinol*; 1994;8:635–642•

Bianco AR, De Laurentis M, Carlomagno C. 20 year update of the naples GUN trial of adjuvant breast cancer therapy: Evidence of interaction between c-erbB-2 expression and tamoxifen efficacy. *Proc Am Soc Clin Oncol*; 17:325b, 1998.

Bouras T, Southey MC, Venter DJ: Overpression of the steroid receptor coactivator AIB1 in breast cancer correlates with the absence of estrogen and progesterone receptors and positivity for p53 and Her2/neu. *Cancer Res*; 61:903-907, 2001.

Bourguet W, Germain P, Gronemeyer H: Nuclear receptor ligand-binding domains: three dimensional structures, molecular interactions and pharmacological implications. *TIPS*; 21:381-388 2000.

Bramlett KS, Wu Y, Burris TP: Ligands specify coactivator nuclear receptor (NR) box affinity for estrogen subtypes. *Mol Endocrinol*; 15:909-922 2001.

Bramlett KS, Burris TP: Effects of selective estrogen receptor modulators (SERMs) on coactivator nuclear receptor (NR) box binding to estrogen receptor. *Mol Gene Metab*; 76:225-233, 2002.

Braun S, Schlimok G, Heumos I, Schaller G, Riethdorf L, Riethmuller G, Pantel K. ErbB2 overexpression on occult metastatic cells in bone marrow predicts poor clinical outcome of stage I-III breast cancer patients. *Cancer Res*; 61(5):1890-1895, 2001.

Brock DJH, Sutcliffe RG. Alpha-fetoprotein in the antenatal diagnosis of anencephaly and spina bifida. *Lancet*; 2:197–194, 1972.

Bunone G, Briand PA, Mikisicek RJ, Picard D. Activation of the unliganded estrogen receptor by EGF involves the MAP kinase pathway and direct phosphorylation. *EMBO J*; 15:2174-83 1996.

Burakov D, Crofts LA, Chang CP, Freedman LP: Reciprocal recruitment of DRIP/Mediator and p160 coactivator complexes in vivo by estrogen receptor. *J. Biol Chem*; 277:14359-62 2002.

Butterfield LH, Koh A, Meng W, Vollmer CM, Economou JS. Generation of human t-cell responses to an HLA-A2.1-restricted peptide epitope derived from alpha-fetoprotein. *Cancer Res*; 59:3134–3142, 1999.

Bychkova VE, Pain RH, Ptitsyn OB. The “molten globule” state is involved in the translocation of proteins across membranes. *FEBS Lett*; 238:231–234, 1988.

Bychkova VE, Ptitsyn OB. The molten globule in vitro and in vivo: Chemtracts. *Biochem Mol Biol*; 4:133–163, 1993.

Bychkova VE, Dujsekina AE, Kleinin SI, Tiktopulo EI, Uversky VN, Ptitsyn OB. Molten globule-like state of cytochrome-C under conditions stimulating those near the membrane surface.

Biochemistry; 35:6058–6063, 1996.

Campbell ID, Bork P. Epidermal growth factor-like modules. *Curr Opin Struct Biol*; 3:385–392, 1993.

Campbell RA, Bhat-Nakshatri P, Patel NM, Constantinidou D, Ali S, Nakshatri H. PI3 kinase/AKT-mediated activation of estrogen receptor alpha: a new model for anti-estrogen resistance. *J Biol Chem*; 276(13): 9817-24. 2001.

Carter DC, He XM. Structure of human serum albumin. *Science*; 249:302–304, 1990.

Cause JF, Curtis Hewitt S, Korach KS: Receptor null mice reveal contrasting roles for estrogen receptor alpha and beta in reproductive tissues. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 74(5):287-96. 2000.

Chou JY, Ito F, Evans G, Chiu FJ, Feldman M. Alpha-fetoprotein biosynthesis and hepatocellular differentiation. *Biochem Biophys Res Commun*; 108:1524–1530, 1982.

Chou JY, Savitz AJ. AFP synthesis in transformed fetal rat liver cells. *Biochem Biophys Res Commun*; 135:844–851, 1986.

Cochet C, Kashles O, Chambaz EM, Borrello I, King CR, Schlessinger J. Demonstration of epidermal growth factor-induced receptor dimerization in living cells using a chemical covalent cross-linking agent. *J Biol Chem*; 263(7):3290-3295, 1988.

Collingwood TN, Urnov FD, Wolffe AP. Nuclear receptor coactivators, corepressors and chromatin remodeling in the control of transcription. *J Mol Endocrinol*; 32:255-275, 1999.

Constans J. Group-specific component is not only a vitamin D binding protein. *Exp Clin Immunogenet* 9:161–175, 1992.

Couse JF, Korach KS. Estrogen receptor null mice: What have we learned and where will they lead us? *Endocr Rev*; 20:358-417, 1999.

Cowley SM, Parker MG: A comparison of transcriptional activation by ER α and ER β , *J Steroid Biochem Mol Biol*; 69:165-175, 1999.

Crandall BF. Alpha-fetoprotein: A review. *CRC Crit Rev Clin Lab Sci* 15:1271–1285, 1981.

Cui Y, Zhang M, Pastell R, Curran EM, Welshons WV, fuqua SA: Phosphorylation of estrogen receptor alpha blocks its acetylation and regulates estrogen sensitivity. *Cancer Res*; 64(24): 9199-208, 2004.

Cullen R, Maguire TM, McDermott EW, Hill ADK, O'Higgins NJ, Duffy MJ: Studies on oestrogen receptor- α and β mRNA in breast cancer. *Eur J Cancer*; 37(9): 1118-22, 2001.

Delage-Mourroux R, Martini PGV, Choi I, Kraichely DM, Hoeksema J, Katzenellenbogen BS: Analysis of estrogen receptor interaction with a repressor of estrogen receptor activity (REA)

and the regulation of estrogen receptor transcriptional activity by REA. *J Biol Chem*; 275:3548-56, 2000.

Denton RR, Notides AC. Estrogen receptor phosphorylation. Hormonal dependence and consequence on specific DNA binding. *J Biol Chem*; 267:7263–7268, 1992.

Deutsch HF. Chemistry and biology of alpha-fetoprotein. *Adv Cancer Res*; 56:253–312, 1991.

Dhanvantari S, Shen FS, Adams T, Snell CR, Zhang C, Markin RB, Morris SJ, Loh YP. Disruption of a receptor-mediated mechanism for intracellular sorting of proinsulin in familial Hyperproinsulinemia. *Mol Endocrinol*; 17(9):1856-67, 2003.

Dorssers, L. C., Van der Flier, S., Brinkman, A., van Agthoven, T., Veldscholte, J., Berns, E. M., Klijn, J. G., Beex, L. V., and Foekens, J. A. Tamoxifen resistance in breast cancer: elucidating mechanisms. *Drugs*; 61: 1721–1733, 2001.

Dotzlaw H, Moehren U, Minik S, Cato ACB, Lluhi JAI, Baniahmad A: The amino terminus of the human AR is target for corepressor action and antihormone agonism. *Mol Endocrinol*; 16:661-73, 2002.

Driscoll MD, Sathya G, Muyan M, Klinge CM, Hilf R, Bambara RA. Sequence requirements for estrogen receptor binding to estrogen response elements. *J Biol Chem*; 273:29321–29330, 1998.

Dudich E, Seminkova L, Gorbatova E, Dudich I, Shingarova L, Korobko V. Alpha-Fetoprotein-induced apoptosis in tumor cells is differentially modulated by RNFR55 and TNFR75-dependent signaling. *Eur Cytokine Network*; 9:488, 1998.

Dudich I, Dudich E, Semenkova LN, Gorbatova EA, Shingarova L, Korobko V. Comparative study of the biological activity of TNFR55 and TNFR75-selective TNF- α mutants using various types of tumor cell lines. *Eur Cytokine Network*; 9:489, 1998.

Dudich E, Semenkova L, Gorbatova E, Dudich I, Khromykh L, Tatulov E, Grechko G, Sukhikh G. Growth-regulative activity of human alpha-fetoprotein for different types of tumor and normal cells. *Tumour Biol*; 19:30-40.1998

Dudich E, Semenkova L, Gorbatova E, Dudich I. Targeting modulation of the TNF-induced apoptosis in tumor cells by human alphafetoprotein: New approach for anticancer therapy. *J Interferon Cytokine Res*; 19:1140, 1999.

Gee JM, Robertson JF, Ellis IO, Nicholson RI. Phosphorylation of ERK1/2 mitogen-activated protein kinase is associated with poor response to anti-hormonal therapy and decreased patient survival in clinical breast cancer. *Int J Cancer*; 95:247-254, 2001.

Geuskens M, Torres JM, Esteban C, Uriel J. Morphological characterization of the pathway of endocytosis and intracellular processing of transferrin and alpha-fetoprotein in human T lymphocytes stimulated with phytohemagglutinin (PHA). *Eur J Cell Biol*; 50:418-27, 1989.

Girault I, Lerebours R, Amarir S, Tozlu S, Tubiana-Hulin M, Lidereau R, Bieche I: Expression analysis of estrogen receptor α coregulators in breast carcinoma: evidence that NCOR1 expression is predictive of the response to tamoxifen. *Clin Cancer Res*; 9:1259-66, 2001.

Goncharova O, Dudich E, Semenkova L, Gorbatova E, Dudich I. Synergy of alpha-fetoprotein and estradiol in suppression of tumor cell growth. *Tumor Biol*; 20(S2):42, 1999.

Gschwind A, Hart S, Fisher OM, Ullrich A. TACE cleavage of proamphiregullin regulates GPCR-induced proliferation and motility of cancer cells. *EMBO J*; 22:2411-21, 2003.

Gustafsson JA, Warner M: Estrogen receptor beta in the breast: role in estrogen responsiveness and development of breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol*; 74(5):245-8, 2000.

Gusterson BA, Gelber RD, Goldhirsch A, Price KN, Save-Soderborgh J, Anbazhagan R, Styles J, Rudenstam CM, Golouh R, Reed R. Prognostic importance of c-erbB-2 expression in breast cancer. International (Ludwig) Breast Cancer Study Group. *J Clin Oncol*; 10(7):1049-1056, 1992.

Gutteridge JMC. Antioxidant properties of the protein caeruloplasmin, albumin, and transferrin: A study of their activity in serum and synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis. *Biochem Biophys Acta* 869:119–127, 1986.

El-Ashry D, Chrysogelos SA, Lippman ME, Kern FG. Estrogen induction of TGF- α is mediated by an estrogen response element composed of two imperfect palindromes. *J Steroid Biochem Mol Biol*; 59:261–269, 1996.

Festin SM, Bennett JA, Fletcher PW, Jacobson HI, Shaye DD, Andersen TT. The recombinant third domain of human alpha-fetoprotein retains the antiestrogenic activity found in the full-length molecule. *Biochim Biophys Acta*; 1427:307-27, 1999.

Filardo EJ, Graeber CT, Quinn JA, Resnick MB, Giri D, DeLellis RA, Steinhoff MM, Sabo E. Distribution of GPR30, a seven membrane-spanning estrogen receptor, in primary breast cancer and its association with clinicopathologic determinants of tumor progression. *Clin Cancer Res*; 12:6359-6366, 2006.

Fisher, B., Costantino, J. P., Wickerham, D. L., Redmond, C. K., Kavanah, M., Cronin, W. M., Vogel, V., Robidoux, A., Dimitrov, N., Atkins, J., Daly, M., Wieand, S., Tan-Chiu, E., Ford, L., and Wolmark, N. Tamoxifen for prevention of breast cancer: report of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 Study. *J. Natl. Cancer Inst. (Bethesda)*; 90: 1371–1388, 1998.

Font de Mora J, Brawn M: AIIB1 is a conduit for kinase mediated growth factor signaling to the estrogen receptor. *Mol Cell Biol*; 20:5041-47, 2000.

Frasor J, Danes JM, Komn B, Chang KC, Lyttle CR, Katzenellenbogen BS: Profiling of estrogen up and down-regulated gene expression in human breast cancer cells: insights into gene networks and pathway underlying estrogenic control of proliferation and cell phenotype. *Endocrinology*; 144(10):4562-74, 2003.

- Fuqua SA, Schiff R, Parra I, Friedrichs WE, Su JL, McKee DD, Slentz-Kesler K, Moore LB, Willson TM, Moore JT. Expression of wild-type estrogen receptor beta and variant isoforms in human breast cancer. *Cancer Res*; 59:5425-5428, 1999.
- Fuqua SA, Wiltshcke C, Zhang QX, Borg A, Castles CG, Friedrichs WE, Hopp T, Hilsenbeck S, Mohsin S, O'Connell P, Allerd DC: A hypersensitive estrogen receptor- α mutation in premalignant breast lesions. *Cancer Res*; 60:4026-29, 2000.
- Halachmi S, Marden E, Martin G, Mackay H, Abbondanza C, Brown M: Estrogen receptor-associated protein: possible mediators of hormone-induced transcription. *Science*; 264:1455-58, 1994.
- Hall JM, Couse JF, Korach KS. The multifaceted mechanisms of estradiol and estrogen receptor signaling. *J. Biol Chem*; 276(40):36869-36872, 2001.
- Harper MJ, Walpole AL: Contrasting endocrine activities of cis and trans isomers in a series of substituted triphenylethylenes. *Nature*; 212:87, 1966.
- Hsourigui M, Thabie N, Martin ME, Benassayag C, Nunez EA. In vivo transient rise in plasma free fatty acids alters the functional properties of alpha-fetoprotein. *Biochim Biophys Acta*; 1125:157-165, 1992.
- Instituto Nacional de Estadística: INE-BASE: Cifras de población al 1 de Enero de 2000: Población Total por Sexo. <http://www.ine.es>
- James A, Chapman R, Walter P. The unfolded protein response: An intracellular signaling pathway with many surprising features. *Trends Cell Biol*; 8:245-249, 2006.
- Jordan VC. The secrets of selective estrogen receptor modulation: cell-specific coregulation. *Cancer Cell*; 1:215-217, 2002.
- Jeltsch JM, Roberts M, Schatz C, Garnier JM, Brown AM, Chambon P. Structure of the human oestrogen-responsive gene pS2. *Nucleic Acids Res*; 15:1401-1414, 1987.
- Karamova ER, Yazova AK, Goussev AI, Yakiemenko EF, Abelev GI. Conformational variants of human alpha-fetoprotein. *Tumor Biol* 19:310-317, 1998.
- Katzenellenbogen BS, Choi I, Delage-mourroux R, Ediger TR, Martini PGV, Montano M, Sun J, Weis K, Katzenellenbogen JA. Molecular mechanisms of estrogen action: selective ligands receptor pharmacology. *J Steroid Biochem Mol Biol*; 74: 279-285, 2000.
- Klein-Hitpass L, Ryffel GU, Heitlinger E, Cato AC. A 13 bp palindrome is a functional estrogen responsive element and interacts specifically with estrogen receptor. *Nucleic Acids Res*; 16:647-663, 1988.
- Kim J, DeHaan G, Nardulli AM, Shapiro DJ. Prebending the estrogen response element destabilized binding of the estrogen receptor DNA binding domain. *Mol Cell Biol*; 17:3173-

3180, 1997.

Klinge CM. Estrogen receptor interaction with co-activators and co-repressors. *Steroid*; 65:227-251, 2000.

Klinge CM. Estrogen receptor interaction with estrogen response elements. *Nucleic Acids Research*; 29:2905–2919, 2001.

Klock G, Strahle U, Schutz G. Oestrogen and glucocorticoid responsive elements are closely related but distinct. *Nature*; 329:734–736, 1987.

Kraus WL, Montano MM, Katzenellenbogen BS. Identification of multiple, widely spaced estrogen responsive regions in the rat progesterone receptor gene. *Mol Endocrinol*; 8:952–969, 1994

Krishnan V, Heath H y Bryant UH. Mechanism of action of estrogen and selective estrogen receptors modulators. *Vitamins and Hormones*; 60:123-147, 2001.

Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA. Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci USA*; 93: 5925-5930, 1996.

Kuiper GG, Shughrue PJ, Merchenthaler I, Gustafsson JA. The estrogen receptor beta subtype: a novel mediator of estrogen action in neuroendocrine systems. *Front Neuroendocrinol*; 19:253–286, 1998.

Kumar R, Thompson EB: The structure of the nuclear hormone receptor. *Steroids*; 64:310-19, 1999.

Kumar R, Thompson EB. Transactivation functions of the N-terminal domains of nuclear hormone receptors: protein folding and coactivator interactions. *Mol Endocrinol*; 17:1-10, 2003.

Lacroix H, Iglehart JD, Skinner MA, Kraus MH. Overexpression of erbB-2 or EGF receptor proteins present in early stage mammary carcinoma is detected simultaneously in matched primary tumors and regional metastases. *Oncogene*; 4(2):145-151, 1989.

Lazarevich NL. Molecular mechanisms of alpha-fetoprotein gene expression. *Biochim (Moscow)*; 65:117–133, 2000.

Lee H, Jiang F, Wang Q, Nicosia SV, Yang J, Su B, Bai W. MEKK1 activation of human estrogen receptor alpha and stimulation of the agonistic activity of 4-hydroxytamoxifen in endometrial and ovarian cancer cells. *Mol Endocrinol*; 14:1882-96, 2000.

Leffert HI, Sell S. Alpha-fetoprotein biosynthesis during the growth cycle of differentiated fetal rat hepatocytes in primary monolayer culture. *J Cell Biol*; 61:823–829, 1974.

Lemire JM, Fausto N. Multiple alpha-fetoprotein RNAs in adult rat liver: Cell type-specific expression and differential regulation. *Cancer Res*; 51:4656–4664, 1991.

Lemire JM, Fausto N. Multiple alpha-fetoprotein RNAs in adult rat liver: Cell type-specific expression and differential regulation. *Cancer Res*; 51:4656–4664, 1991.

Levi F, Bosetti C, Lucchini F, Negri E, La Vecchia C. Monitoring the decrease in breast cancer mortality in Europe. *Eur J Cancer Prev*. Dec;14(6):497-502, 2005.

Li MS, LI PF, Yang FY, He SP, Du GG, Li G. The intracellular mechanism of alpha-fetoprotein promoting the proliferation of NIH 3T3 cells. *Cell Res*; 12(2):151-56. 2002.

Lichenstein HS, Lyons DE, Wurfel MM, Johnson DA, McGinley MD, Leidle JC, Trollinger DB, Mayer JP, Wright SD, Zukowski MM. Afamin is a new member of the albumin, alpha-fetoprotein and vitamin D-binding protein gene family. *J Biol Chem*; 269:18149– 18154, 1994.

Lorenzo HC, Geuskens M Macho A, Lachkar S, Verdiere-Sahuque M, Pineiro A, Uriel J. Alpha-fetoprotein bining and uptake by primary cultures of human skeletal muscle. *Tumour Biol*; 17:251-60. 1996.

Lorimer GH. A quantitative assessment of the role of the chaperonin in protein folding in vivo. *FASEB J*; 10:509, 1996.

Lou WJ, Wang H. Li H, Kim KB, Shah S, Lee HJ, Thinakaran G, Kim TW, Yu G, Xu H. Pen-2 and APH-1 coordenately regulate proteolytic processing of presenilin 1. *J Biol Chem*; 278:7850-4, 2003.

Luft AJ, Lorscheider FL. Structural analysis of human and bovine alpha-fetoprotein by election microscopy, image processing, and circular dichroism. *Biochemistry*; 22:5978–5981, 1983

Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P Schutz G, Umesono K, Blumberg B, Katner P, Mark M. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell*; 83:835-839,1995.

Martin MB, Franke TF, Stoica GE, Chambon P, Katzenellenbogen BS, Stoica BA, McLemore MS, Olvi SE, Stoica A. A role for Akt in mediating the estrogenic funtions of epidermal growth factor and insuline-like growth factor I. 141:4503-11, 2000.

Martin LA, Farmer I, Johnston SR, Ali S, Dowsett M. Elevated ERK1/ERK2/ estrogen receptor cross-talk enhance estrogen-mediated signaling during long-term estrogen deprivation. *Endocr Relat Cancer*; 12 Suppl 1:S75-84, 2005.

Masamura S, Santner SJ, Heitjan DF. Estrogen deprivation causes estradiol hypersensitivity in human breast cancer cell. *J Clin Endocrinolo Metab*; 80:2918-2925 1995.

Mass R. The role of Her-2 epression in predicting response to therapy in breast cancer. *Semin Oncol*; 27:46-52 2000.

McKenna NJ and O'Malley BW: Combinatorial control of gene expression by nuclear receptor and coregulators. *Cell*; 108:465-474 2002.

McLeod JF, Cooke NE. The vitamin D-binding protein, alphafetoprotein, albumin multigene family: Detection of transcripts inmultiple tissues. *J Biol Chem*; 264:21760–21769, 1989.

Medina-Kauwen LK, Leung V, Wu L, Kedes L. Assessing the binding and endocytosis activity of cellular receptor using GFP-ligand fusions. *Biotechniques*; 29:602-4, 606-8, 609, 2000.

Mesfin FB, Bennett JA, Jacobson HI, Zhu S, Andersen TT. Alpha-fetoprotein-derived antiestrogenic octapeptide. *Biochim Biophys Acta*; 1501:33-43. 2000.

Mesfin FB, Andersen TT, Jacobson HI, Zhu S, Bennett JA. Development of a synthetic cyclized peptide derived from alpha-fetoprotein that prevents the growth of breast cancer. *J Peptide Res*. In Press, 2001.

Mizejewski GJ, Vonnegut M, Jacobson HI. Estradiol-activated alphafetoprotein suppresses the uterotrophic response to estrogens. *Proc Soc Natl Acad Sci U S A*; 80:2733-2737, 1983.

Mizejewski GJ. New insights into AFP structure and function: Potential biomedical applications. In: Mizejewski GJ, Porter IH, Eds. *Alpha-Fetoprotein and Congenital Disorders*. Orlando: Academic Press, pp5-34, 1985.

Mizejewski GJ. An apparent dimerization motif in the third domain of alpha-fetoprotein: Molecular mimicry of the steroid/thyroid nuclear receptor superfamily. *Bioessays* 15:427-432, 1993.

Mizejewski GJ. The phylogeny of alpha-fetoprotein in vertebrates: Survey of biochemical and physiological data. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 5:281-316, 1995.

Mizejewski GJ. Alpha-fetoprotein as a biologic response modifier: Relevance to domain and subdomain structure. *Proc Soc Exp Biol Med* 215:333-362, 1997.

Mizejewski GJ, Dias JA, Hauer CR, Henrikson KP, Gierthy J. Alphafetoprotein derived synthetic peptides: Assay of an estrogen modifying regulatory segment. *Mol Cell Endocrinol*; 118:15-23, 1998.

Morales-Vázquez. Estrategias clínicas y Desarrollo de las Bases Científicas en el Empleo de Hormonoterapia para Cáncer de Mama. *Cancerología*; 1:163-175, 2006.

Moro R, Tamaoki T, Wegmann TG, Longenecker BM, Laderoute MP. Monoclonal antibodies directed against a widespread oncofetal antigen: the alpha-fetoprotein receptor. *Tumour Biol*; 14:116-30 1993.

Moro R, Gulyeva-Tcherkassova J and Stieber P. Increased alpha-fetoprotein receptor in the serum of patients with early-stage breast cancer. *Current Oncology*, 19:e1-8, 2012.

Mosselman J, Polman R. Dijkema, ER: identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Lett*; 392: 49-53, 1996.

Mouridsen H, Gershanovich M, Sun Y, Perez-Carrion R, Boni C, Monnier A, Apffelstaedt J, Smith R, Sleeboom HP, Jaenicke F, Pluzanska A, Dank M, Becquart D, Bapsy PP, Salminen E, Snyder R, Chaudri-Ross H, Lang R, Wyld P, Bhatnagar A. Phase III study of letrozole versus tamoxifen as first-line therapy of advanced breast cancer in postmenopausal women:

analysis of survival and update of efficacy from the International Letrozole Breast Cancer Group. *J Clin Oncol* 21(11):2101-2109, 2003.

Moy B, Goss PE. Estrogen receptor pathway: resistance to endocrine therapy and new therapeutic approaches. *Clin Cancer Res*;12:4790–3, 2006.

Nabholtz JM, Bonneterre J, Buzdar A, Robertson JF, Thurlimann B. Anastrozole (Arimidex) versus tamoxifen as first-line therapy for advanced breast cancer in postmenopausal women: survival analysis and updated safety results. *Eur J Cancer* 39(12):1684-1689, 2003.

Naval J, Villacampa MJ, Goguel AF, Uriel J. Cell type-specific receptors for AFP in a mouse T-lymphoma cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 82:3301–3304, 1985.

Nicholson RI, Hutcheson IR, Harper ME. Modulation of epidermal growth factor receptor in endocrine-resistant, estrogen-receptor positive breast cancer. *Ann N Y Acad Sci*; 963:104-115 2002.

Niehans GA, Singleton TP, Dykoski D, Kiang DT. Stability of HER-2/neu expression over time and at multiple metastatic sites. *J Natl Cancer Inst*; 85(15):1230- 1235, 1993.

Nilsson S, Mäkelä S, Treuter E, Tjuange M, Thomsen J, Anderson G, et al. Mechanisms of estrogen action. *Physiol Rev*; 81:1535-1565, 2001.

Norris JD, Fan D, Wagner BL, McDonnell DP. Identification of the sequences within the human complement 3 promoter required for estrogen responsiveness provides insight into the mechanism of tamoxifen mixed agonist activity. *Mol Endocrinol*; 10:1605–1616. 1996.

Nunes EA. Biological role of alpha-fetoprotein in the endocrinological field: data and hypotheses. *Tumour Biol*; 15:63-72. 1994.

Ogawa S, Inoue S, Watanabe T, Hiroi H, Orimao A. The complete primary structure of human estrogen receptor beta (hER beta) and its heterodimerization with ER alpha in vivo and in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*;243:122–126. 1998.

Osborne CK, Shou J, Massarweh S, Schiff R. Crosstalk between estrogen receptor and growth factor receptor pathways as a cause for endocrine therapy resistance in breast cancer. *Clin Cancer Res*;11:865s–70s. 1999.

Palmieri C, Cheng GJ, Saji S, Zelada-Hedman M, Warri A, Weiua Z, et al. Estrogen receptor beta in breast cancer. *Endocr Relat Cancer*; 9: 1-13,2002.

Paridaens R, Therasse P, Dirix L, Beex L, Piccart M, Cameron D, Cufer T, Roozendaal K, Nooij M, Mattiacci MR. First line hormonal treatment for metastatic breast cancer with exemestane or tamoxifen in postmenopausal patients. A randomized phase III trial of the EORTC Breast Group. *Proc Am Soc Clin Oncol*; 23:6a, 2004.

Pattus F, Massotte D, Wilmsen HU, Lakey J, Tsernoglou D, Tucker A, Parker MW. Colicins: Prokaryotic killer-pores. *Exp* 46:180–192.1990.

- Pawson T, Schlessinger J. sh2 and sh3 domains. *Curr boil*; 3(7):434-442, 1993.
- Petropoulos C, Andrews G, Tamaoki T, Fausto N. Alpha-fetoprotein and mRNA levels in liver regeneration and carcinogenesis. *J Biol Chem*; 258:4901–4906, 1983.
- Petropoulos C, Yaswen P, Panzica M, Fausto N. Cell lineages in liver carcinogenesis: Possible clues from studies of the distribution of AFP mRNA sequences in cell populations isolated from normal regenerating and preneoplastic rat livers. *Cancer Res* 45:5762–5768, 1985.
- Pietras RJ, Arboleda J, Reese DM, Wongvipat N, Pegram MD, Ramos L, et al. HER-2 tyrosine kinase pathway targets estrogen receptor and promotes hormone-independent growth in human breast cancer cells. *Oncogene*;10:2435–46. 1995.
- Plowman GD, Culouscou JM, Whitney GS, Green JM, Carlton GW, Foy L, Neubauer MG, Shoyab M. Ligand-specific activation of HER4/p180erbB4, a fourth member of the epidermal growth factor receptor family. *Proc Natl Acad Sci USA*; 90(5):1746-1750, 1993.
- Prossnitz ER, Barton M. The G-protein-coupled estrogen receptor GPER in health and disease. *Nat Rev Endocrinol*; Aug 16;7(12):715-26, 2011.
- Resnick EM, Schreihof DA, Periasamy A, Shupnik, MA. Truncated estrogen receptor product-1 suppresses estrogen receptor transactivation by dimerization with estrogen receptors α . *J Biol Chem*; 275:7158–7166, 2000.
- Richard S, Zingg HH. The human oxytocin gene promoter is regulated by estrogens. *J Biol Chem*; 265:6098 –6103, 1990.
- Rosendfeld MG and Glass CK: Co-regulator codes of transcriptional regulation by nuclear receptors. *J Biol Chem*; 274(40):36865-68, 2001.
- Sarcione EJ, Hart D. Biosynthesis of alpha-fetoprotein by MCF-7 human breast cancer cell. *Int J Cancer* ; 35:315–318, 1985.
- Schiff R, Massarweh SA, Shou J, et al. Advanced concepts in estrogen receptor biology and breast cancer endocrine resistance: implicated role of growth factor signaling and estrogen receptor coregulators. *Cancer Chemother Pharmacol*; 561:10–20, 2005.
- Seal W, Hanstein B, Brown M, Moore DD. Inhibition of estrogen receptor action by the orphan receptor SHP (short heterodimer partner). *Mol Endocrinol*; 12:1551–1557, 1998.
- Semenkova LN, Dudich EI, Dudich IV, Shingarova LN, Korobko VG. Alpha-fetoprotein as a TNF-resistance factor for human hepatocarcinoma cell line HepG2. *Tumor Biol*; 18:30–40, 1997.
- Semenkova LN, Dudich EI, Dudich IV. Alpha-fetoprotein-induced apoptosis of human hepatoma cells. *Tumor Biol*; 19:261–274, 1998.
- Shim WS, Conaway M, Masamura s, Yue W, Wang JP, Santen RJ. Estradiol hypersensitivity

and mitogen activated protein kinase expression in long-term estrogen deprived human breast cancer cells in vivo. *Endocrinology*; 14:396-405 2000.

Shim CL and O'Malley BW. Coregulator function: A key to understanding tissue specificity of selective modulators endocrine. *Reviews*; 25(1):45-71 2004.

Shou J, Massarweh S, Osborne CK. Mechanisms of tamoxifen resistance: Increased estrogen receptor-Her-2/neu cross-talk in ER/Her-2-positive breast cancer. *J Natl Cancer Inst*; 96:926-935 2004.

Siegmund D, Hadwinger P, Pfizenmaier K, Vorniocher HP, Wajant H. Selective inhibition of FLICE-like inhibitory protein expression with small interfering RNA oligonucleotides is sufficient to sensitive tumor cells for TRAIL-induced apoptosis. *Mol Med* 8:725-32. 2002.

Smalley JR, Sarcione EJ. Synthesis of alpha-fetoprotein by immature rat uterus. *Biochem Biophys Res Commun*; 92:1429-1434, 1980.

Smith CJP, Kelleher PC. Alpha-fetoprotein molecular heterogeneity: Physiologic correlation with normal growth, carcinogenesis, and tumor growth. *Biochim Biophys Acta*; 605:1-32, 1980.

Smith I, Dowsett M. Comparison of anastrozole vs tamoxifen alone in combination as neoadjuvant treatment of estrogen receptor-positive (ER+) operable breast cancer in postmenopausal women: The IMPACT trial. *Breast Cancer Res Treat*; 82:S6 2003 (abstr 1).

Speirs V, Kerin MJ. Prognostic significance of oestrogen receptor beta in breast cancer. *Br. Surg*; 87:405-409, 2000

Takata K, Kamakura K, Satomura S, Taga H. Lectin-dependent modulation of interaction between human alpha-fetoprotein and its monoclonal antibodies. *Tumor Biol*; 19:318-328, 1998.

Tamaoki T, Fausto N. Expression of the alpha-fetoprotein gene during development, regeneration, and carcinogenesis In: Stein G, Stein J, Eds. *Recombinant DNA and Cell Proliferation*. New York: Academic Press; pp145-168, 1984.

Tatarinov YS. Content of embryo-specific alpha-globulin in the blood serum of the human fetus, newborn, and adult man in primary cancer of the liver. *Vop Khim SSR* 11:20-24, 1965. *phys Acta*; 869:119-127, 1986.

Tcherkassova J, Abramovich C, Moro R, Chen C, Schmit R, Gerber A, Moro R. Combination of CA125 and RECAF biomarkers for early detection of ovarian cancer. *Tumor Biol*; 32:831-838, 2011.

Teng CT, Liu Y, Yang N, Walmer D, Panella T. Differential molecular mechanism of the estrogen action that regulates lactoferrin gene in human and mouse. *Mol Endocrinol*; 6:1969-1981, 1992.

Toder V, Bland M, Gold-Geftler L, Nebel J. The effect of alphafetoprotein on the growth of placental cells in vitro. *Placenta*; 4:79-86, 1983.

- Torres JM, Uriel J. Alpha-fetoprotein mediated uptake of fatty acids by human T lymphocytes. *J Cell Physiol*; 150:456-62. 1992.
- Torres JM, Carracq N, Uriel J. Membrane proteins from lymphoblastoid cells showing cross-affinity for alpha-fetoprotein and albumin. Isolation and characterization. *Biochem Biophys Acta* 1159:60–66. 1992.
- Torres JM, Geuskens M, Uriel J. Receptor-mediated endocytosis and recycling of alpha-fetoprotein in human B-lymphoma and T-leukemia cells. *Int J Cancer*; 47:110-7.1996
- Tzukerman MT, Esty A, Santiso-Mere D, Danielian P, Parker MG, Stein RB, Pike JW, McDonnell DP. 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, 1994.
- Uversky VN, Ptitsyn OB. All-or-none solvent-induced transitions between native, molten globule, and unfolded states in globular proteins. *Fold Design*; 1:117–122, 1996.
- Van der Groot FG, Gonzalez-Manas JM, Lakey JH, Pattus F. A molten globule membrane-insertion intermediate of the pore-forming domain of colicin-A. *Nature*; 354:408–410, 1991.
- Villacampa MJ., Moro R., Naval J., Faily-Crepin C., Lampreave F., Uriel J. Alpha-fetoprotein receptor in human breast cancer cell line. *Biochem Biophys Res Commun.* 122:1322-1327; 1984.
- Wan YJY, Jimenez-Molina JJ, Chou JY. Fetal and variant AFPs are encoded by mRNAs that differ in sequence at the 5' end. *Biochemistry*; 27:7269–7276, 1988.
- Weigel NL, Zhang Y. Ligand-independent activation of steroid hormone receptors. *J Mol Med* ;76:469-479, 1998.
- Weihua Z, Andersson S, Cheng G, Simpson ER, Warner M, Gustafsson J. Update on estrogen signaling. *FEBS Lett*; 546:17-24, 2003
- Weiner DB, Kokai Y, Wada T, Cohen JA, Williams WV, Greene MI. Linkage of tyrosine kinase activity with transforming ability of the p185neu oncoprotein. *Oncogene*; 4(10):1175-1183, 1989
- Weisz A, Bresciani F. Estrogen induces expression of c-fos and c-myc protooncogenes in rat uterus. *Mol Endocrinol*; 2:816–824, 1988.
- Weisz A, Rosales R. Identification of an estrogen response element upstream of the human c-fos gene that binds the estrogen receptor and the AP-1 transcription factor. *Nucleic Acids Res*; 18:5097–6106,1990.
- White R, Parker MG: Molecular mechanisms of steroid hormone action. *Endo-crine- Related Cancer*; 5:1-14, 1998.

- Witek A, Skalba P, Paul M, Graniczka M, Mazurek U, Chromy G, Wilczok T. Evaluation of wild-type estrogen receptor beta and its isoforms: ER-beta/ delta 5/6 i ER-beta/delta 6 in endometrial adenocarcinoma. *Ginecol Pol.* 74:897-902, 2003.
- Wong ZW, Ellis MJ. First-line endocrine treatment of breast cancer: aromatase inhibitor or antioestrogen? *Br J Cancer.* 90(1):20-25, 2004.
- Wright c, Nicholson S, AngusB, Sainsbury JR, Fardon J, Cairns J, Harris AL, Horne CH. Relationship between c-erbB2 protein product and response to endocrine therapy in advanced breast cancer. *Br J Cancer;* 65:118-21, 1992.
- Yakimenko EF, Karamova ER, Goussev AI, Hilgers J, Abelev GI, Yazova AK. Epitope mapping of human alpha-fetoprotein. *Tumor. Biol* 19:301–309, 1998. *Biochem Biophys Res Commun,* 135:844–851, 1986.
- Yang F, Luna VJ, McAnelly RD, Neberhaus KH, Cupples RI, Bowman BH. Evolutionary and structural relationships among the group specific component, albumin and alpha-fetoprotein. *Nucleic Acids Res;*13:8007–8017, 1985.
- Xu Y, Martin S, James DE, Hong W. GS15 forms a SNARE complex with syntaxin 5, GS28 and Ykt6 and is implicated in traffic in the early cisternae of Golgi apparatus. *Mol Biol Cell;* 13:3493-3507, 2002.
- Zhu L, Chow LW, Loo WT. Her-2/neu expression predicts the response to anti-aromatase neoadjuvant therapy in primary breast cancer. Subgroup analysis from celecoxib anti aromatase neoadjuvant trial. *Clin Cancer Res;* 10:4639-4644, 2004.