



Universidad Autónoma Metropolitana
Unidad Iztapalapa

División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Posgrado en Biología Experimental

“Efecto de indol-3-carbinol y di-indolmetano sobre el metabolismo de estrógenos en células MCF-7 de cáncer mamario humano estrógeno-dependientes”

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

**P R E S E N T A:
MARIO FERNANDO ORTIZ MATAMOROS**

COMITÉ TUTORAL

Directora: Dra. Ana Elena Lemus Bravo

Asesor: Dr. Pablo Gustavo Damián Matzumura

Asesora: Dra. Patricia García López

México D.F. Noviembre 2008.

COMITÉ TUTORAL

DIRECTORA

Dra. Ana Elena Lemus Bravo

Profesora Titular C, adscrita al Departamento de Biología de la
Reproducción, División de Ciencias Biológicas y de la Salud,
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.
anaelenalemus@prodigy.net.mx

ASESOR

Dr. Pablo Gustavo Damián Matzumura

Profesor Titular C, adscrito al Departamento de Biología de la
Reproducción, División de Ciencias Biológicas y de la Salud,
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.
pgdm@xanum.uam.mx

ASESORA

Dra. Patricia García López

Investigadora en Ciencias Médicas D, adscrita a la Subdirección de
Investigación Básica, Instituto Nacional de Cancerología.
garcia_lopez@salud.gob.mx

JURADO DE EXAMEN

Dr. Pablo Gustavo Damián Matzumura

Profesor Titular C, adscrito al Departamento de Biología de la
Reproducción, División de Ciencias Biológicas y de la Salud,
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.
pgdm@xanum.uam.mx

Dra. Patricia García López

Investigadora en Ciencias Médicas D, adscrita a la Subdirección de
Investigación Básica, Instituto Nacional de Cancerología.
garcia_lopez@salud.gob.mx

Dra. Juana Enríquez Jiménez

Investigadora en Ciencias Médicas B, adscrita al laboratorio de
Bioquímica Hormonal, Departamento de Biología de la Reproducción,
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.
juanaenriquez@yahoo.com.mx

M. en B.E. Joaquín F. Herrera Muñoz

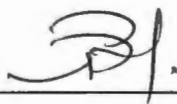
Profesor Titular C, adscrito al Departamento de Ciencias de la Salud,
División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma
Metropolitana-Iztapalapa.
johemu@yahoo.com.mx

Agradecimientos al CONACyT por la beca otorgada para la realización de estudios de Maestría durante el periodo de 2005-2007 (número de becario: 198309), al Sistema Nacional de Investigadores por la beca de Ayudante de Investigador del Dr. Gregorio Pérez Palacios, al Posgrado en Biología Experimental por el apoyo otorgado (UAM-I: 309- 0) y al Dr. Fernando Larrea Gallo, Jefe del Departamento de Biología de la Reproducción del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, por el apoyo y las facilidades otorgadas para la realización de este trabajo.

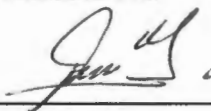
Proyecto apoyado parcialmente con fondos del Macroproyecto SDI.PTID-05-3, UNAM, con fondos de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, UAM-I y del Departamento de Biología de la Reproducción, INCMNSZ.

La Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa está evaluada como Posgrado de Alto Nivel en el Programa Nacional de Posgrado del CONACyT (C/PFPN-2002-35-32).

Los miembros del jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, abajo firmantes, aprobaron la tesis titulada: "Efecto de indol-3-carbinol y di-indolmetano sobre el metabolismo de estrógenos en células MCF-7 de cáncer mamario humano estrógeno-dependientes"



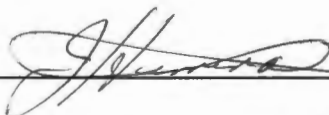
Dr. Pablo Gustavo Damián Matzumura
Departamento de Biología de la Reproducción
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.
PRESIDENTE



Dra. Patricia García López
Subdirección de Investigación Básica
Instituto Nacional de Cancerología.
SECRETARIA



Dra. Juana Enríquez Jiménez
Departamento de Biología de la Reproducción
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.
VOCAL



M. en B.E. Joaquín F. Herrera Muñoz
Departamento de Ciencias de la Salud
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.
VOCAL

*Dedicado a mis padres: **Fernando y Alejandra**
a mis hermanos: **Vania, Belén, Abril y Luis***

AGRADECIMIENTOS:

A **Rebeca**, por todos los desvelos y parte de esto también es tuyo!

A mi familia: a los **Ortiz** y a los **Matamoros** por su amor y apoyo.

A **Rosa, Verónica y Rebeca** por su amistad incondicional.

A **Yared** Gracias por todos esos momentos.

A mis compañeros y amigos de la Maestría: **Luis, Nadia, Gloria, Karla, Oreth, Martha y Gerardo**: Gracias por su amistad.

A la **Dra. Ana Elena Lemus Bravo** por todos los conocimientos transmitidos y ayudar en mi formación como Biólogo Experimental.

Al **Dr. Gregorio Pérez Palacios** por su apoyo.

A mis compañeros de laboratorio: **René, Efrén, Juana, Bertha y Felipe**.

A **Luis Ramos y Sara Córdoba** por su amistad.

A mis colegas **Ángeles y Leticia** por su ayuda y apoyo.

A **Daniela y Victoria** del Departamento de Nefrología.

A mis compañeros y amigos del **ICMyL**.

Al **Dr. Pablo Damián Matzumura** gracias por su apoyo y ser parte de mi formación.

Al **M. en B.E. Joaquín Herrera Muñoz** por formarme como Biólogo Experimental y enseñarme que no todo lo que dicen los libros es verdad.

Al **Prof. Manuel Castillo** por sus aportes a este trabajo.

A la **Dra. Mina Königsberg Fainstein** por su apoyo.

Un sincero agradecimiento a los miembros del Jurado: **Dr. Pablo Gustavo Damián Matzumura, Dra. Patricia García López, Dra. Juana Enríquez Jiménez, M. en B.E. Joaquín F. Herrera Muñoz** por los valiosos comentarios y por el tiempo que dedicaron a esta Tesis.

ÍNDICE

Resumen.....	9
Abstract.....	10
Introducción.....	11
Antecedentes.....	26
Justificación.....	30
Hipótesis.....	31
Objetivo General.....	32
Objetivos Particulares.....	32
Material y Métodos.....	33
Resultados.....	37
Discusión y Conclusiones.....	51
Referencias.....	56

RESUMEN

El cáncer de mama en México es la primera causa de muerte por neoplasias malignas en mujeres de 25 años y más. Su origen es multifactorial y en gran proporción es estrógeno dependiente. En la glándula mamaria, los estrógenos se biotransforman a metabolitos hidroxilados en el carbono 2 (catecolestrógenos) y en el carbono 16, formando 2-hidroxiestrone (2-OHE₁), 2-hidroxiestradiol (2-OHE₂), 16 α -hidroxiestrone (16 α -OHE₁) y estriol (E₃). Evidencias experimentales y clínicas han permitido correlacionar el aumento en la excreción urinaria de 16 α -OHE₁, así como la disminución de 2-OHE₁ y 2-OHE₂, con el incremento en el riesgo de desarrollar cáncer de mama. Por otra parte, se ha demostrado que el indol-3-carbinol (I3C) y su dímero el di-indolmetano (DIM), formado en el tracto digestivo, son capaces de incrementar la expresión de enzimas con actividad de 2-hidroxilación, requeridas para la formación de catecolestrógenos. Para estudiar el efecto de diferentes concentraciones de I3C y DIM sobre el metabolismo del estradiol y la estrone isotópicamente marcados con ¹⁴C en las células MCF-7 de cáncer mamario humano estrógeno-dependientes, se realizaron incubaciones por periodos variables de tiempo. Los productos de conversión metabólica se identificaron y cuantificaron por el método de disolución isotópica inversa. Los resultados demostraron que tanto el I3C como el DIM incrementaron la formación de 2-OHE₂, siendo el DIM significativamente más efectivo. Los resultados obtenidos apoyan el concepto de que el consumo o suplementación alimentaria con indoles, particularmente con DIM, representa potencialmente una estrategia quimiopreventiva en el cáncer mamario, al mismo tiempo que estos datos proporcionan información valiosa para el desarrollo de programas de investigación en el área de la farmacología clínica.

ABSTRACT

In Mexico, breast cancer is the first cause of death by malignant neoplasias in women aging 25 years and more. Its origin is multifactorial and in high proportion of cases are estrogen-dependent. In the mammary gland, estrone and estradiol are hydroxylated in either C-2 or C-16 forming the catecholestrogens 2-hydroxyestrone (2-OHE₁), 2-hydroxyestradiol (2-OHE₂) or 16 α -hydroxyestrone (16 α -OHE₁) and estriol (E₃), respectively. Experimental and clinical evidence has allowed correlate an increase of 16 α -OHE₁ and a diminution of 2-OHE₁ and 2-OHE₂ in the urinary excretion, with the increase of risk to breast cancer. On the other hand, it has been demonstrated that indole-3-carbinol (I3C) and its dimer di-indolylmethane (DIM), which is formed after the ingestion of I3C, are able to increase the expression of 2-hydroxylase, the enzyme required for the formation of catecholestrogens. To study the effect of different concentrations of I3C and DIM on the metabolism of ¹⁴C-estradiol and ¹⁴C-estrone in MCF-7 cells, derived from estrogen-dependent human mammary cancer, a series of incubations at variable periods of time were conducted. The metabolic conversion products were identified and quantified using a reverse isotopic dilution technique. The results demonstrated that both I3C and DIM were able to significantly increase the formation of 2-OHE₂, being DIM significantly more potent than I3C. These results provide most valuable information for the development of research programs of clinical pharmacology and support the concept that a diet rich in I3C or supplementation with the indoles, particularly with DIM, could represent a strategy for prevention of risk of mammary cancer.

INTRODUCCIÓN

A nivel mundial, el cáncer de mama es la principal causa de muerte de las mujeres por padecimientos oncológicos, registrándose anualmente más de un millón de nuevos casos. En México, de acuerdo a los datos del Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI), el cáncer de mama representó hasta el año 2005 la segunda causa de muerte por neoplasias malignas en las mujeres. Sin embargo, en el año 2006 este padecimiento pasó a ocupar el primer lugar, considerándose como un problema grave de salud pública [Figura 1].

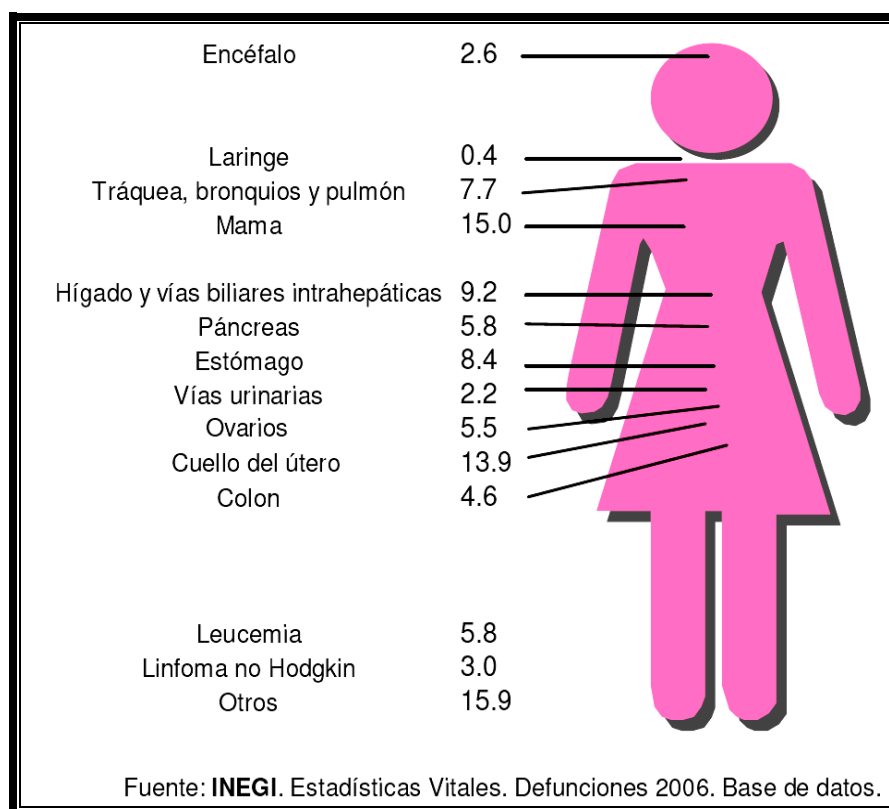


Figura 1. Distribución porcentual de las principales causas de defunción por tumores malignos en las mujeres en el año 2006 en México. [INEGI 2008]

Factores de Riesgo

El cáncer de mama es una entidad patológica multifactorial que se presenta principalmente en la mujer, aunque también el hombre puede llegar a padecerla, sin embargo, la relación de cáncer de mama entre mujeres y hombres es aproximadamente de 100:1, por lo que el género es un factor de riesgo importante [Martínez-Tlahuel y col. 2006].

Los antecedentes familiares directos de cáncer mamario (abuela, madre y hermanas) son otro factor de riesgo, aunque la predisposición genética para esta enfermedad es baja, ya que su asociación con mutaciones de los genes *BRCA1* y *BRCA2* representa menos del 10% de los casos de cáncer mamario [Jong y col. 2002].

Por otra parte, el cáncer de mama se incrementa con la edad, duplicándose el riesgo cada década, hasta la menopausia. En el 46% de las mujeres mexicanas que son afectadas por el cáncer de mama, éste se presenta antes de los 50 años de edad, siendo la neoplasia más frecuente a partir de los 25 años y el grupo de edad más afectado es el de 40-49 años [INEGI 2008].

En estudios epidemiológicos se ha demostrado que dentro de los factores de riesgo para esta neoplasia maligna se encuentran algunos hábitos alimenticios (dieta baja en vegetales) [Hilakivi-Clarke y col. 2004, Davis y Milner 2007] y la obesidad [Lorincz y Sukumar 2006].

Entre los factores de riesgo asociados con el desarrollo de cáncer mamario se encuentran los relacionados con la función reproductiva de la mujer, como la menarquia temprana (menor de 12 años), menopausia tardía (posterior a 54 años), nuliparidad, primer embarazo tardío (después de los 30 años), ausencia de lactancia al seno materno y la terapia hormonal con estrógenos por tiempo prolongado que se ha asociado con el desarrollo de cáncer mamario [Dumitrescu y Cotarla 2005].

Estrógenos y Cáncer Mamario

El mecanismo preciso por el cual los estrógenos pueden inducir el inicio y progresión del cáncer mamario no ha sido del todo determinado, sin embargo, datos experimentales y clínicos demuestran que, así como los estrógenos son requeridos para el desarrollo normal de la glándula mamaria, también pueden ser un factor importante en la carcinogénesis [Khan y col. 2005, Russo y col. 2006, Russo y Russo 2006]. En modelos experimentales animales se ha demostrado que la administración continua de dosis suprafisiológicas de estrógenos induce altos porcentajes de adenocarcinomas mamarios, mientras que bajas dosis administradas por largos periodos de tiempo pueden inducir fibroadenomas [Russo y Russo 1996].

En la mujer en edad reproductiva, los estrógenos se sintetizan principalmente en el ovario, mientras que en la etapa posmenopáusica estas hormonas se forman por la aromatización periférica de los andrógenos ováricos y suprarrenales. De acuerdo con los experimentos de Redd y colaboradores

[1989], el estradiol presente en la circulación no contribuye significativamente al contenido total de estrógenos en los tumores mamarios, ya que la mayoría de los estrógenos presentes en estos tumores son biosintetizados *in situ*. En efecto, la concentración de estradiol en tejidos de cáncer mamario no difiere entre los obtenidos de mujeres premenopáusicas y los de posmenopáusicas, ya que aún cuando la concentración plasmática del estradiol disminuye en un 90% después de la menopausia, el total de estrógenos en mujeres posmenopáusicas provienen de la aromatización *in situ* de los andrógenos circulantes.

Mecanismo de Acción de los Estrógenos

Un gran número de funciones biológicas de los estrógenos están mediadas a través de sus receptores de estrógenos nucleares (RE) los cuales, una vez que se unen a su ligando específico, forman complejos estrógeno-receptor, translocan al núcleo, forman dímeros e inducen la expresión de genes específicos. De acuerdo con este modelo clásico, las respuestas biológicas de los estrógenos, incluyendo sus efectos mitogénicos, están mediadas por los RE, de los cuales existen dos subtipos: el receptor de estrógenos α (RE α) y el receptor de estrógenos β (RE β) [Figura 2]. La unión de dos complejos RE α o RE β forman homodímeros mientras que la unión de un complejo RE α con uno RE β forma heterodímeros [Koehler y col. 2005].

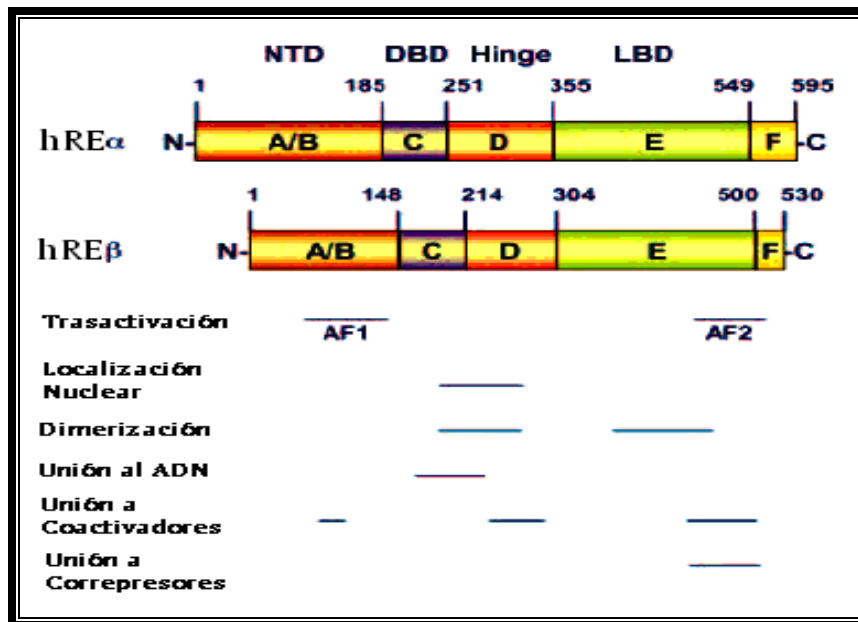


Figura 2. Dominios estructurales de los RE α y RE β humanos y sus principales funciones. NTD: dominio Amino Terminal, DBD: dominio de unión al DNA, Hinge: región bisagra, LBD: dominio de unión al ligando, AF-1: dominio de transactivación 1, AF-2: dominio de transactivación 2. Los RE α y RE β son altamente homólogos en las regiones o dominios responsables de la unión específica al DNA y al ligando [Koehler y col. 2005].

La existencia de los dos subtipos de RE (α y β) sugiere tres vías de acción de los estrógenos: homodímeros en tejidos que solamente expresen cada subtipo (RE α /RE α o RE β /RE β) y a través de la formación de heterodímeros en los tejidos que expresen ambos subtipos (RE α /RE β).

Metabolismo de Estrógenos

El estradiol (E_2) y la estrona (E_1) son los dos estrógenos más activos biosintetizados por el ovario durante las fases folicular y lútea del ciclo menstrual. En el ovario, existe interconversión entre E_1 y E_2 , aunque con predominio hacia la formación de E_2 . Una vez que los estrógenos son biosintetizados y secretados a la circulación periférica, llegan al órgano blanco en el que van a ejercer sus efectos, ya sea *per se*, o por mecanismos de acción alternos, mediados por la acción de los productos de su metabolismo [Zhu and Conney 1998].

La glándula mamaria es capaz de biotransformar a los estrógenos a varios metabolitos hidroxilados [Figura 3]. Los principales cambios estructurales de las moléculas de E_1 y E_2 , catalizados por enzimas específicas son:

- 1) La oxido-reducción del oxígeno del carbón 17 mediado por las enzimas 17 β -hidroxiesteroide-deshidrogenasas.
- 2) La hidroxilación en el carbono 2 del anillo A de E_1 y E_2 por la enzima CYP1A1, para formar 2-hidroxiestrona (2-OH E_1) y 2-hidroxiestradiol (2-OH E_2), los cuales, por su estructura tipo catecol, han sido denominados como catecolestrógenos.

3) La hidroxilación de E_1 o E_2 en el carbono 16 en orientación α , mediante las enzimas CYP3A4 y CYP3A7, para formar 16α -hidroxiestróna (16α -OHE₁) o estriol (E_3) [Lemus y Pérez-Palacios 2001].

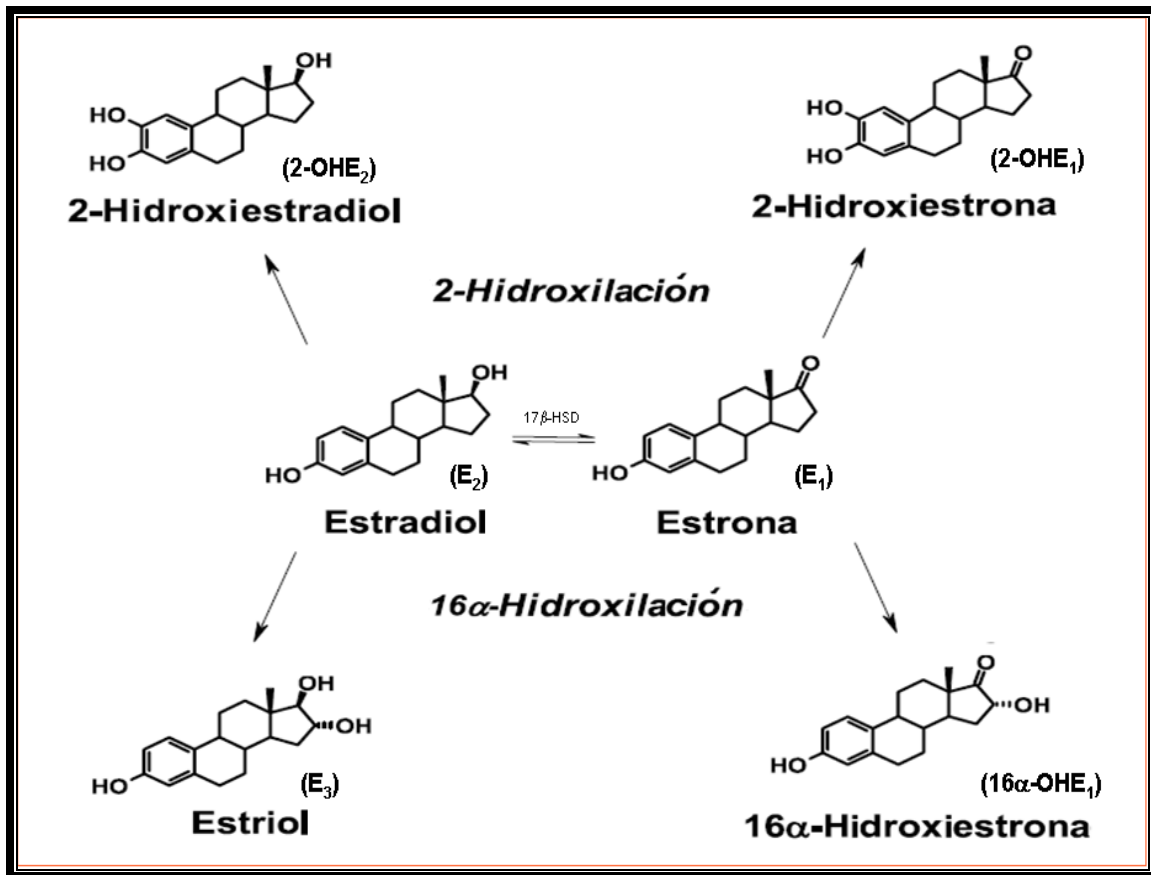


Figura 3. Metabolismo de estrógenos en la glándula mamaria.

Metabolitos 2- y 16 α - Hidroxilados en el Cáncer de Mama

La formación de metabolitos 2 y 16 α -hidroxilados de estrona y estradiol representa un importante papel en el desarrollo de cáncer de mama. En efecto, existen evidencias de una correlación entre el incremento de la formación de 16 α -OHE₁, la disminución de los metabolitos 2-hidroxilados de los estrógenos y el desarrollo del cáncer mamario [Bradlow y col. 1985, Adlercreutz y col. 1994, Ursin y col. 1999, Muti y col. 2000, Ursin y col. 2002].

Se ha reportado que la 16 α -OHE₁ puede inducir la proliferación de células de cáncer mamario MCF-7 de manera similar al estradiol y que este metabolito 16 α -hidroxilado es capaz de aumentar la síntesis de DNA y estimular la expresión de las ciclinas D y A, además de incrementar la actividad de la cinasa replicativa Cdk2 y la fosforilación de pRb (supresor de tumores), alterando de esta forma la expresión y función de proteínas reguladoras del ciclo celular [Lewis y col. 2001, 2005, Kim y col. 2005]. Es importante destacar que aún cuando la afinidad de la 16 α -OHE₁ por el receptor intracelular de estrógenos es menor a la de estradiol, este metabolito es capaz de unirse en forma covalente, a través de la formación de una base de Schiff, a residuos de lisina del receptor de estrógenos [Bucala y col. 1982, Swaneek y Fishman 1988]. El complejo resultante de esta unión permanente es capaz de inducir, de manera constante el crecimiento celular [Yager y Liehr 1996] [Figura 4].

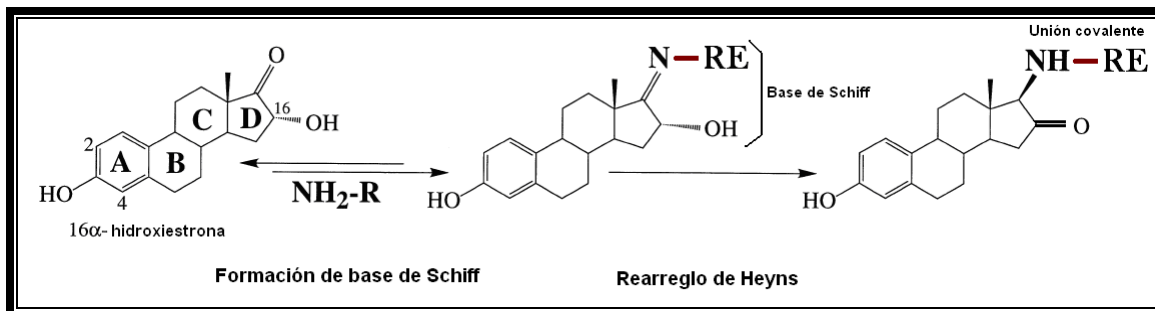


Figura 4. Formación de la unión permanente entre 16α-OHE₁ y el grupo amino de los residuos de lisina del receptor de estrógenos (RE). La reacción reversible entre la 16α-OHE₁ y el grupo amino resulta en la formación de una base de Schiff, la que posteriormente formará una unión covalente 16 ceto-17β-amino estrógeno mediante un rearrreglo de Heyns [Zhu y Conney. 1998].

Por el contrario, la formación de los compuestos 2-hidroxilados no incrementa el riesgo a desarrollar carcinoma de mama debido a su baja actividad estrogénica, además se ha reportado que tanto 2-OHE₁ como 2-OHE₂, pueden detener el crecimiento de líneas celulares de cáncer mamario, particularmente 2-OHE₁ la cual es capaz de inhibir el crecimiento y proliferación de células MCF-7 [Shneider y col. 1984]. Por otra parte, 2-OHE₂ por la acción de la catecol-*o*-metil-trasferasa forma 2-metoxiestradiol [Dawling y col. 2001], el cual es un potente inhibidor de la proliferación celular tumoral y de la angiogénesis [D'Amato y col. 1994, Fotsis y col. 1994, Hamel y col. 1996, Klauber y col. 1997, Ricker y col. 2004, Lewis y col. 2005].

La hidroxilación de los estrógenos es mediada por enzimas (citocromos P450) que están presentes en el hígado y en diversos tejidos extrahepáticos. Se ha encontrado que diferentes isoformas de los citocromos P450 (CYP) se expresan

en la glándula mamaria y presentan una actividad catalítica selectiva para la hidroxilación región-específica de los estrógenos endógenos [Zhu y Lee 2005] [Figura 5]. Estos CYP constituyen una superfamilia de proteínas presentes en procariontes y eucariontes y son parte de la fase I del sistema de desintoxicación celular.

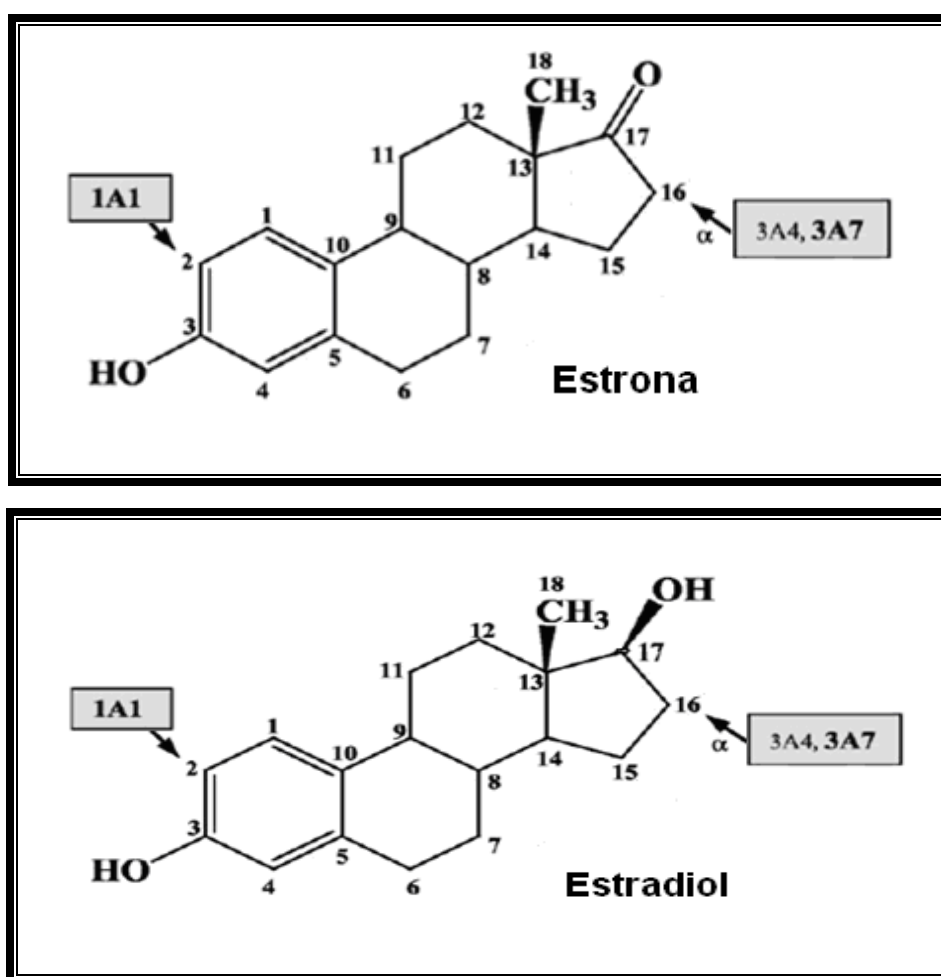


Figura 5. Estructura química de estrona y estradiol. Los sitios susceptibles a la oxidación metabólica por diferentes CYP en la glándula mamaria están indicados en los recuadros [Zhu y Lee 2005].

Sistema de Desintoxicación Celular

Los seres vivos están expuestos a innumerables componentes químicos, ajenos a su organismo, llamados xenobióticos. A través del curso de la evolución, se ha desarrollado un sistema de desintoxicación celular para eliminarlos. Este sistema está constituido por enzimas que, al modificar las estructuras de los xenobióticos, cambian la naturaleza hidrofóbica a hidrofílica, facilitando su excreción [Shimada 2006].

El proceso de biotransformación de xenobióticos está dividido en tres fases [Figura 6]. Fase I: se caracteriza por el incremento de la polaridad de los compuestos mediante la introducción de moléculas de oxígeno. Las enzimas que activan esta reacción oxidativa pertenecen a la familia de los citocromos P450 (CYP).

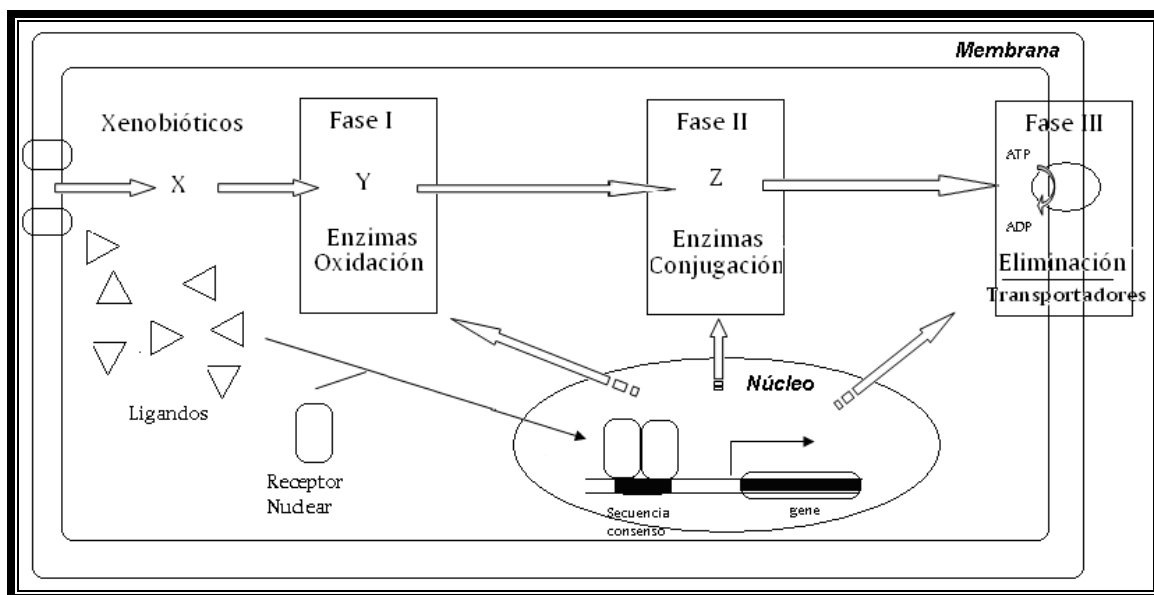


Figura 6. Esquema de las fases de desintoxicación celular y el papel de los receptores nucleares en la inducción de enzimas y transportadores en este sistema.

Los CYP funcionan como mono-oxigenasas, con actividades que comprenden desde la síntesis y degradación de las hormonas esteroideas endógenas, vitaminas y derivados de ácidos grasos (endobióticos), hasta el metabolismo de compuestos exógenos como medicamentos, contaminantes ambientales y carcinógenos (xenobióticos). La superfamilia de genes de los citocromos P450 está subdividida y clasificada con base en la homología de sus aminoácidos, su organización genética y filogenia. Después del símbolo común CYP, el cual se deriva de *cytochrome* P450 (450 es la longitud de onda, expresada en nanómetros, a la cual absorben la luz), se asigna un número que corresponde a la familia a la cual pertenece (generalmente grupos de proteínas con una homología en sus aminoácidos mayor al 40%), luego se designa una letra que corresponde a la subfamilia (homología mayor a 55%) y finalmente un número para el gen; por ejemplo CYP1A1 [Werck-Reichhart y Feyereisen 2000].

En el humano, las variaciones sustanciales entre los individuos con respecto a la actividad enzimática de los CYP, son determinadas por diferentes factores moduladores que incluyen: polimorfismos genéticos, edad, género, estado de salud-enfermedad, tabaquismo, consumo de alcohol y factores dietéticos como la ingestión de cierto tipo de vegetales [Vrzal y col. 2004].

En la fase II, los productos oxigenados de la fase I se conjugan con pequeñas moléculas endógenas hidrofílicas para formar glucurónidos, sulfatos, acetatos y metoxilos, produciendo así productos aún más hidrofílicos que puedan ser excretados más fácilmente. Entre las enzimas de la fase II se encuentran: la UDP-glucuronosil transferasas, N-acetil transferasas, glutatión-S-transferasas y la catecol-*o*-metil-transferasa (COMT).

En 1992, Ishikawa propuso un mecanismo para la fase III de desintoxicación enfatizando la importancia biológica de las bombas translocadoras dependientes de ATP. A partir de entonces se han descubierto más de 40 diferentes transportadores humanos dependientes de ATP (*ATP-binding cassette* [ABC]) y se ha demostrado que varios de ellos, por ejemplo, ABCB1, ABCB11, ABCC1, ABCC2 y ABCG2, son críticos en el transporte de xenobióticos y de sus metabolitos. Por otra parte, existe una fuerte evidencia de que ABCA1, ABCG1, ABCG5 y ABCG8, tienen un papel importante en la excreción de biomoléculas endógenas como esteroides y oxистерoles, bajo la regulación de receptores nucleares y sus ligandos. [Nakata y col. 2006].

Inducción de la 2-Hidroxilación en la Glándula Mamaria

Los CYP tienen la capacidad de metabolizar un amplio rango de xenobióticos además de poder ser inducidos por estos [Nagata y Yamazoe 2002]. Los CYP de las familias 1 a 4 son capaces de metabolizar componentes endógenos, incluidos los esteroides, y muestran complejos patrones de expresión tejido-específicos, de género y desarrollo, los cuales son controlados por hormonas o factores de crecimiento [Jefcoate y col. 2000].

El CYP1A1 se expresa en la glándula mamaria y presenta una alta actividad catalítica para la 2-hidroxilación de los estrógenos. Este CYP es inducido por xenobióticos y está bajo el control transcripcional del receptor de los hidrocarburos de arilo (AHR) [Ma 2001] presente en múltiples tejidos y órganos [Poland y col. 1976]. El AHR es miembro de la superfamilia de receptores

nucleares activados por ligando; sin embargo, el análisis de la secuencia del gen *AHR* y del translocador nuclear de AHR (Arnt) ha demostrado que ambos genes son miembros de la familia de factores de transcripción agrupados por el dominio estructural *basic helix-loop-helix* (bHLH). Existe una variabilidad considerable en el peso molecular del AHR en las diferentes especies y estas diferencias están asociadas principalmente con su dominio C-terminal. En contraste, en AHR y Arnt hay una alta homología en los dominios N-terminal, bHLH, unión al DNA y PAS (Per, Arnt, Sim). La figura 7 ilustra los diferentes dominios y funciones asociadas con las regiones específicas de AHR y Arnt, compartidas por la creciente familia de proteínas bHLH/PAS [Hogenesh y col. 1997].

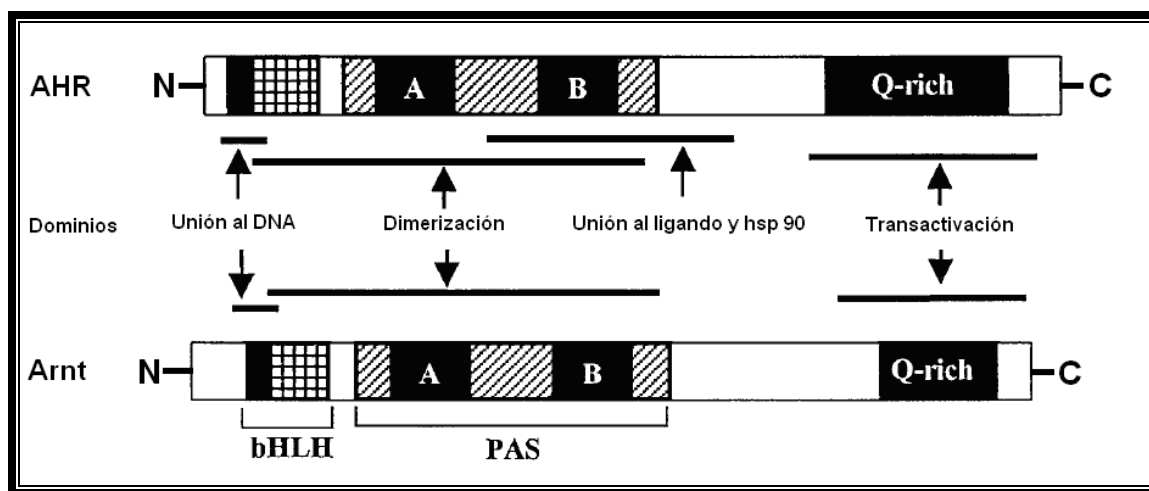


Figura 7. Dominios y funciones de AHR y Arnt. AHR: Receptor de los hidrocarburos de arilo. Arnt: translocador nuclear de AHR. bHLH: *basic helix-loop-helix*. PAS: Per, Arnt, Sim. Hsp 90: proteína de choque térmico.

El AHR puede ser activado por su unión a hidrocarburos aromáticos policíclicos [Hogenesch y col. 1997, Chang y Puga 1998, Chen y col. 1998, Nebert y col. 2004, Kim y Milner 2005] y una vez unido al ligando, el AHR citosólico se disocia de las proteínas chaperonas y rápidamente forma un complejo nuclear heterodimérico (AHR/Arnt), el cual se une al elemento de respuesta a xenobióticos o dioxinas (XREs o DREs) localizado en el promotor del gen *CYP1A1* e interactúa subsecuentemente con la maquinaria de transcripción basal, resultando en un incremento de la expresión génica [Figura 8]. Por otro lado, el factor designado represor de AHR (AHRR) inhibe la función de AHR por competencia de unión con Arnt y la unión a las secuencias XREs o DREs. Consecutivamente AHR y AHRR forman un circuito regulador en la vía de transducción de señales de xenobióticos y provee un mecanismo de regulación para la función de AHR como un sensor de contaminantes ambientales tejido-específico [Nakata y col. 2006]. La secuencia de unión en XREs o DREs contiene un pentanucleótido consenso GCGTG requerido para la unión de AHR/Arnt. La secuencia guía requerida para la transactivación ha sido identificada en la región promotora 5' del *CYP1A1* así como de varios genes blanco de AHR [Shimada 2006].

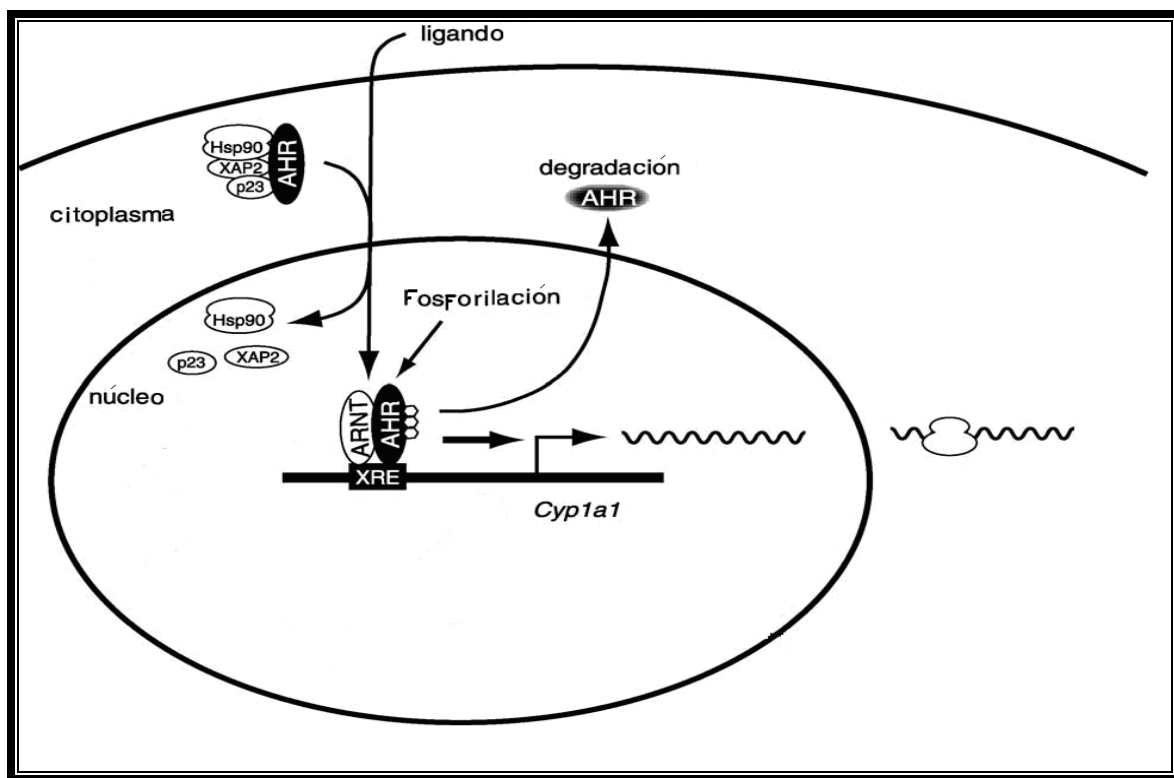


Figura 8. Mecanismo de inducción de la expresión del *CYP1A1* en la glándula mamaria, mediante la unión del ligando con el AHR. AHR: receptor de los hidrocarburos arilo, HSP90: proteína de choque térmico, XAP2: proteína cochaperona, p23: proteína cochaperona, ARNT: translocador nuclear de AHR, XRE: elementos de respuesta a xenobióticos. [Mimura y Fuji-Kuriyama 2003].

ANTECEDENTES

El cáncer de mama es la neoplasia maligna más frecuente en las mujeres a nivel mundial. Sin embargo, los índices de frecuencia y mortalidad de este padecimiento son altamente variables con respecto al país y a su localización geográfica. Los países que presentan la mayor frecuencia son: Estados Unidos de Norteamérica, Inglaterra y Dinamarca, mientras que Singapur, China y Japón son los países con menores índices de cáncer de mama [Ferlay y col. 2002]. En

años recientes se ha observado el incremento en la incidencia y mortalidad por cáncer de mama en estos países asiáticos, donde se ha producido un cambio del estilo de vida. De igual forma, las mujeres asiáticas inmigrantes a los Estados Unidos de Norteamérica han presentado un incremento muy notable en la frecuencia de cáncer mamario en comparación con la población femenina en su país de origen, sobretodo si provienen de comunidades rurales [Safe 1998]. Este fenómeno también se observa en nuestro país donde existen diferencias regionales importantes, siendo los estados del norte y centro del país los que presentan mayor frecuencia de cáncer de mama, donde las mujeres tienen un estado socioeconómico y cultural más elevado con estilo de vida más semejante al de la mujer de los Estados Unidos de Norteamérica (tabaquismo, obesidad, sedentarismo, ingesta de alcohol y baja calidad de dieta), mientras que en los estados donde predomina la población indígena de menor nivel socioeconómico (Chiapas, Oaxaca y Yucatán) la frecuencia es mucho más baja [INEGI 2008]. Estas observaciones sugieren que los factores ambientales y de estilo de vida, principalmente la modificación de la dieta, tienen un papel importante en el desarrollo del cáncer de mama.

La ingesta de vegetales frescos está asociada con la disminución del riesgo de desarrollar diferentes tipos de cáncer. Dentro de este grupo de alimentos se encuentran las crucíferas (brócoli, col, coliflor, col de Bruselas, etc.) cuyo consumo cotidiano se asocia con la reducción en el riesgo de padecer cáncer, particularmente en colon, pulmón, próstata, cérvix y glándula mamaria [Zhang y col. 1992, Fahey y col. 1997, Bonnesen y col. 2001, Milner 2004].

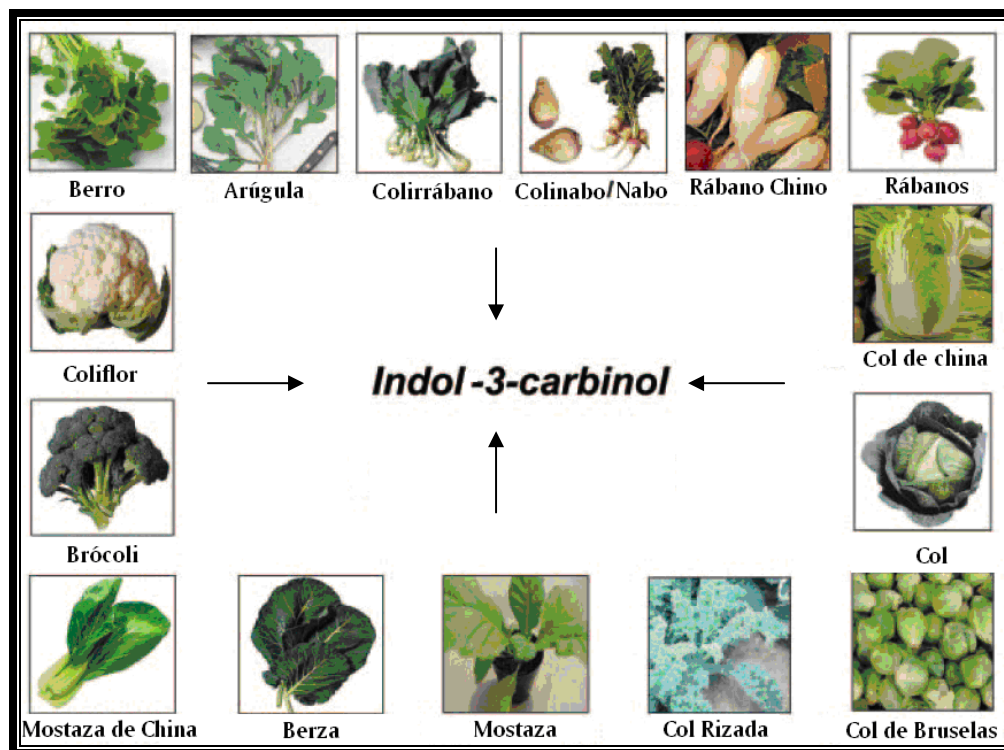


Figura 9. Vegetales Crucíferos que contienen indol-3-carbinol [modificado de Aggarwal e Ichikawa 2005].

Uno de los componentes alimentarios bioactivos más estudiados, presente en las crucíferas, es el compuesto heterocíclico indol-3-carbinol (I3C) [Figura 9], que se forma a partir del indol-metil-glucosinolato por el efecto de la cocción o la digestión. Posterior a su ingestión, el I3C es convertido a su dímero el di-indolmetano (DIM), dentro del tracto gastrointestinal por la acidez del medio [Figura 10] [Fahey y col. 1997].

Se han descrito diversas propiedades antineoplásicas para el I3C [Aggarwal e Ichikawa 2005] y el DIM, entre ellas: arresto del ciclo celular [Cover y col. 1998, 1999, Cram y col. 2001, Hong y col. 2002 A, 2002 B, Firestone y Bjeldanes 2003, Zhang y col. 2003, García y col. 2005], la inducción de la apoptosis [Ge y

col. 1996, Sarkar y col. 2003, Rahman y Sarkar 2005, Chen y col. 2006, Gong y col. 2006, Rahman y col. 2006, Savino y col. 2006], bloqueo de la angiogénesis [Chang y col. 2005, 2006], la reparación del ADN y la activación de enzimas de la fase I de desintoxicación [Kim y Milner 2005].

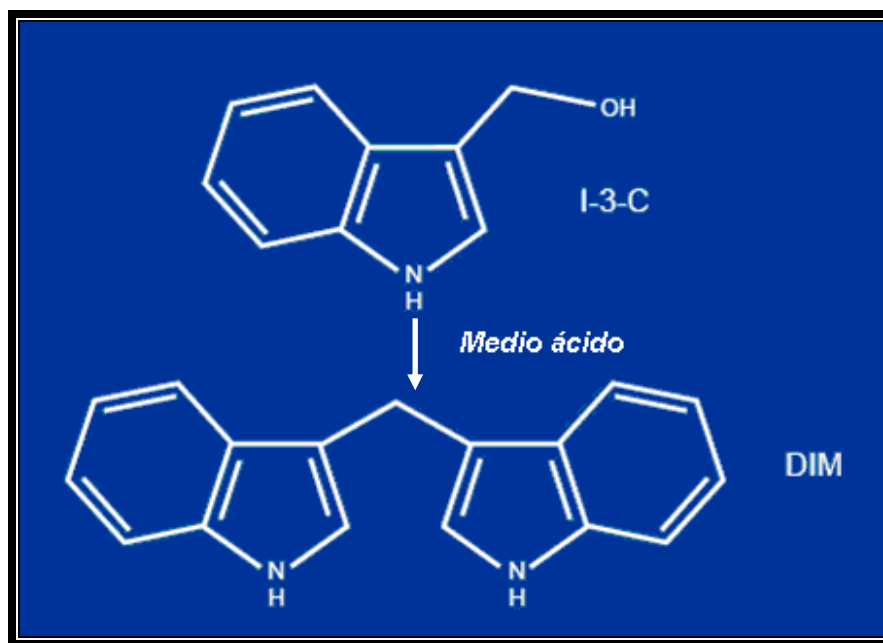


Figura 10. Estructuras químicas del indol-3-carbinol (I3C) y di-indolmetano (DIM).

Se ha observado que en la glándula mamaria y en varias líneas celulares de cáncer, el I3C y DIM incrementan, a través del AHR, la expresión del CYP1A1, enzima responsable de la 2-hidroxilación de los estrógenos [Chen y col.1996, 1998, Horn y col. 2002, Ociepa-Zawal y col. 2007], sugiriendo un efecto de estos indoles sobre la biosíntesis de compuestos 2-hidroxilados de los estrógenos.

JUSTIFICACIÓN

En México, el cáncer mamario constituye la primera causa de muerte por neoplasias malignas en la población femenina de 25 años y más, lo que representa un enorme desafío en materia de salud pública. En el año 2006 se reportaron 4,930 defunciones por cáncer mamario, lo cual equivale a que diariamente murieran 13 mujeres mexicanas, constituyendo una verdadera inequidad de género. El notable incremento en la ocurrencia de cáncer de mama en México, particularmente en las regiones norte y occidente así como en el Distrito Federal, está relacionado con las transiciones demográfica y epidemiológica que vive nuestro país, así como con los patrones alimentarios y los estilos de vida contemporáneos importados de otros países. Por el origen multifactorial del cáncer de mama ha sido difícil el desarrollo de métodos de prevención y de detección oportuna del riesgo de desarrollar esta neoplasia maligna. Actualmente con las estrategias de detección del cáncer mamario empleadas no se han obtenido los resultados esperados, debido a que la autoexploración de las glándulas mamarias, y aún la exploración clínica realizada por el médico, no son lo suficientemente efectivas para la detección temprana de cáncer mamario, por lo que el único método diagnóstico actualmente disponible es la visualización de las glándulas mamarias mediante la mastografía. Sin embargo, en nuestro país, no se cuenta con la suficiente infraestructura para la realización de estos procedimientos, ni con el número adecuado de profesionales y técnicos en imagenología, por lo que la mayoría de los tumores malignos de la mama son diagnosticados en etapas avanzadas y las mamografías se han utilizado más con fines diagnósticos que de

prevención. Es, por lo tanto, impostergable el desarrollo de nuevas estrategias para la prevención y tratamiento del cáncer mamario.

Aunque no se conoce el mecanismo exacto por el cual los estrógenos pueden causar cáncer, se ha relacionado que la formación de metabolitos de los estrógenos, específicamente la $16\alpha\text{OHE}_1$, está vinculada con el desarrollo y progresión del cáncer mamario, por el contrario, la formación de compuestos 2-hidroxilados disminuye el riesgo a este padecimiento. En este trabajo de investigación se plantea la posibilidad de desarrollar una estrategia que favorezca la formación de metabolitos 2-hidroxilados de los estrógenos, disminuyendo así uno de los factores de riesgo a cáncer de mama.

HIPÓTESIS

En las células de cáncer mamario humano MCF-7 estrógeno-dependientes, el indol-3-carbinol y su dímero di-indolmetano, al ser capaces de modificar el metabolismo de los estrógenos, incrementarán la vía de formación de compuestos 2-hidroxilados.

OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto del indol-3-carbinol y su dímero di-indolmetano sobre el metabolismo *in vitro* de estrona y estradiol isotópicamente marcados, empleando como modelo experimental la línea celular de cáncer de mama humano dependiente de estrógenos MCF-7.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Estudiar el metabolismo *in vitro* de estrona y estradiol, isotópicamente marcados con ^{14}C , en células MCF-7 de cáncer mamario humano, dependientes de estrógenos.
2. Analizar el efecto de diferentes concentraciones de indol-3-carbinol y di-indolmetano sobre el metabolismo de estrona y estradiol, durante periodos de tiempo variables en las células MCF-7.
3. Comparar los efectos de indol-3-carbinol y di-indolmetano sobre el metabolismo de estrona y estradiol, en las células MCF-7.

MATERIAL Y MÉTODOS

Esteroides y reactivos

Los esteroides radiactivos estrona 4-[^{14}C] ($\text{E}_1\text{-}^{14}\text{C}$), con actividad específica (a.e.) de 54 mCi/mmola, y el estradiol 4-[^{14}C] ($\text{E}_2\text{-}^{14}\text{C}$), a.e. de 54 mCi/mmola, se adquirieron de American Radiolabeled Chemical, Inc. (San Luis, MO, EUA). La pureza radioquímica de estos compuestos se estableció por su movilidad en cromatografía en papel y en capa fina, en dos sistemas de disolventes de diferente polaridad, así como por recristalizaciones de una alícuota del esteroide purificado, con una cantidad exacta del esteroide auténtico radioinerte, hasta que la actividad específica permaneció constante en por lo menos dos cristalizaciones sucesivas y fue idéntica a la de las aguas madres.

Todos los reactivos y disolventes que se utilizaron en el estudio fueron de grado analítico.

Material biológico

La línea celular de cáncer mamario humano estrógeno-dependiente (RE α y β positivo) MCF-7, derivada de una paciente con cáncer mamario metastásico, fue proporcionada amablemente por el Dr. Alejandro Zentella (Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán). Las células se mantuvieron en cultivo en medio Eagle modificado por Dulbecco, libre de rojo de fenol y con alto contenido de glucosa (DMEM-HG), suplementado con 10 % de suero de bovino fetal, 100 U/ml de penicilina y 100 mg/ml de estreptomicina, a 37° C en un incubador metabólico Thermo Electron Corp, Modelo HEPA Class 100 (Marlette, OH, EUA), en una atmósfera húmeda de 95 % O₂:5 % CO₂.

Incubaciones

Las células MCF-7 (2.0×10^6) se incubaron en DMEM-HG, suplementado con 10 % de suero de bovino fetal (previamente tratado con una suspensión de carbón activado-Dextran T-70 para eliminar los esteroides presentes) y antibióticos (100 U/ml de penicilina y 100 mg/ml de estreptomicina). Como sustratos se adicionaron E₁-¹⁴C ó E₂-¹⁴C a la concentración de 200 nM y 75,000 dpm, en presencia de I3C o DIM disueltos en etanol en concentraciones de 10, 50 y 100 μ M y ácido ascórbico a una concentración de 50 μ M, como agente antioxidante. Las incubaciones se realizaron por diferentes periodos de tiempo (24, 48, 72 y 96 horas) en el incubador metabólico, bajo una atmósfera de

O₂:CO₂ (95 %:5 %). Al término del periodo de incubación la reacción se detuvo con la adición de acetato de etilo (EtOAc) y la extracción de los esteroides formados, se realizó con este mismo disolvente. Como controles se utilizaron incubaciones con E₁-¹⁴C y E₂-¹⁴C en ausencia de células o en ausencia de los indoles.

Productos de la Conversión Metabólica de Estrona-¹⁴C y Estradiol-¹⁴C

La separación e identificación de los metabolitos de E₁ y E₂, formados durante las incubaciones, se llevó a cabo mediante el método de dilución isotópica inversa [Lemus y col. 2001]. El extracto orgánico de EtOAc se evaporó a sequedad y se agregaron por separado 10 µg de cada uno de los siguientes *carriers*: E₁, E₂, E₃, 2-OHE₁, 2-OHE₂ y 16α-OHE₁. La separación de los metabolitos radiactivos se realizó por medio de cromatografía en placa fina en dos sistemas:

- 1) ciclohexano:acetato de etilo (50:50)
- 2) cloroformo:acetona (95:5)

Como referencia se utilizaron 10 µg de cada uno de los mismos esteroides. La detección de los *carriers* y referencias, en la placa cromatográfica, se realizó mediante una reacción de color con el reactivo formado por ácido acético:ácido sulfúrico:*p*-anisaldehído (50:1:1) y exposición a calor (120 °C) durante 3 minutos. Cada una de las zonas que desarrolló color se cortó, se eluyó con metanol y se determinó su contenido de ¹⁴C en un espectrómetro de

centelleo líquido Packard, Modelo 1900 TR (Downes Grove, IL, EUA), utilizándose una solución de centelleo constituida por 4 g/l de PPO (2,5-difeniloxazol) y 100 mg/l de dimetil POPOP [1,4-bis-2-(4-metil-5-fenil-oxazolil) benceno] disueltos en tolueno. La corrección del apagamiento (quenching) en la detección de la radiactividad, se realizó en forma automática por estandarización externa.

Análisis Estadístico

La formación de los diferentes metabolitos de estrona y estradiol, en las células MCF-7, están expresados como la media y la desviación estándar de los valores obtenidos en cada zona radiactiva. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba de ANOVA, utilizando *a posteriori* la prueba de comparaciones múltiples de Tukey-Kramer para establecer las diferencias significativas entre los controles y los grupos experimentales, considerándose significativas con valores de $p < 0.05$.

RESULTADOS

En el extracto orgánico de EtOAc se recuperó el 96% del material radiactivo incubado en la fracción metanólica. Este extracto se separó por cromatografía en placa fina, donde se detectaron cinco zonas que desarrollaron color con el reactivo de *p*-anisaldehído y que correspondieron a los “*carriers*” de E_3 ($R_F = 0.05$), 2-OHE₂ ($R_F = 0.19$), 16 α OHE₁ y 2-OHE₁ ($R_F = 0.33$), E_2 ($R_F = 0.41$) y E_1 ($R_F = 0.61$). Los metabolitos 16 α OHE₁ y 2-OHE₁ no pudieron ser separados por ningún sistema cromatográfico utilizado, por lo que esta zona se presenta en las gráficas como “16 α OHE₁/2-OHE₁”.

INCUBACIONES CON E_1 -¹⁴C

Controles

El análisis de la placa de cromatografía de los controles en ausencia de células, mostró únicamente una zona radiactiva correspondiente al sustrato E_1 -¹⁴C incubado.



El análisis del perfil metabólico de las incubaciones de E_1 - ^{14}C en las células MCF-7 en ausencia de indoles, demuestra que el principal producto metabólico fue E_2 , representando aproximadamente el 80% del sustrato a las 24 h y el 90% a las 96 h de incubación. Por otra parte, la bioconversión de E_1 - ^{14}C a $16\alpha OHE_1/2-OHE_1$ fue de 2.5% (24 h) y 1.3%, (96 h). La formación de E_3 fue de 1.5% y de 0.8% a las 24 y 96 h respectivamente, mientras que la biotransformación a $2OHE_2$ fue de 1.6% después de 24 h y de 2.1% al finalizar las 96 h de incubación.

Metabolismo de E_1 - ^{14}C en presencia de I3C en células MCF-7

El E_2 fue el principal producto metabólico en las incubaciones de E_1 - ^{14}C en presencia de diferentes concentraciones de I3C, siendo significativamente menor que el control, a partir de las 48 h de incubación y con la concentración de 100 μM , [Figura 11]. Por otra parte, el I3C no presentó efecto sobre la formación de $16\alpha OHE_1/2-OHE_1$, con respecto a los controles [Figura 12]. La conversión de E_1 a E_3 fue menor al 2% en todas las concentraciones de I3C y se observó un ligero incremento a partir de las 48 h [Figura 13]. Finalmente la bioconversión de E_1 - ^{14}C a $2-OHE_2$ se incrementó cuando las células se incubaron con I3C y en función del tiempo de incubación [Figura 14].

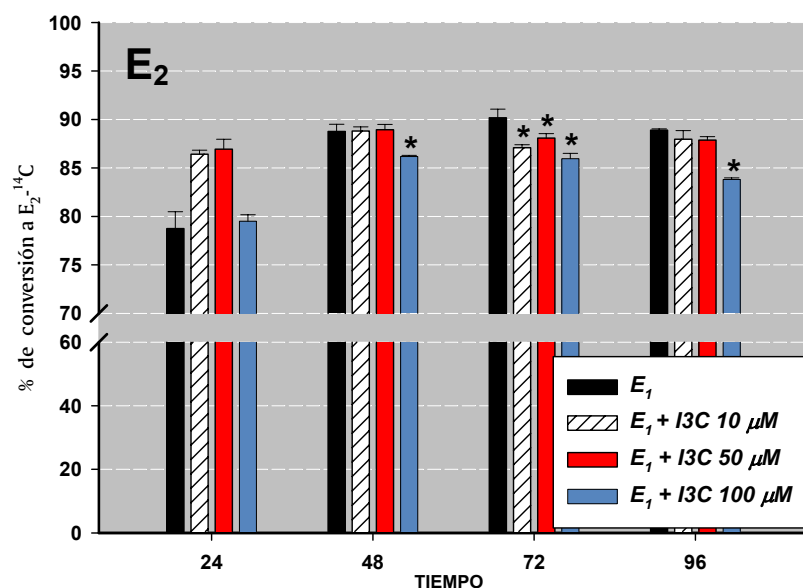


Figura 11. Bioconversión de E_1 a E_2 en las células MCF-7, en ausencia y presencia de I3C 10, 50 y 100 μM , por diferentes tiempos de incubación. Cada barra representa la media $\pm$ la desviación estándar de tres experimentos realizados por triplicado. Los asteriscos representan diferencias estadísticas ($p < 0.05$) con respecto al control (en ausencia de I3C).

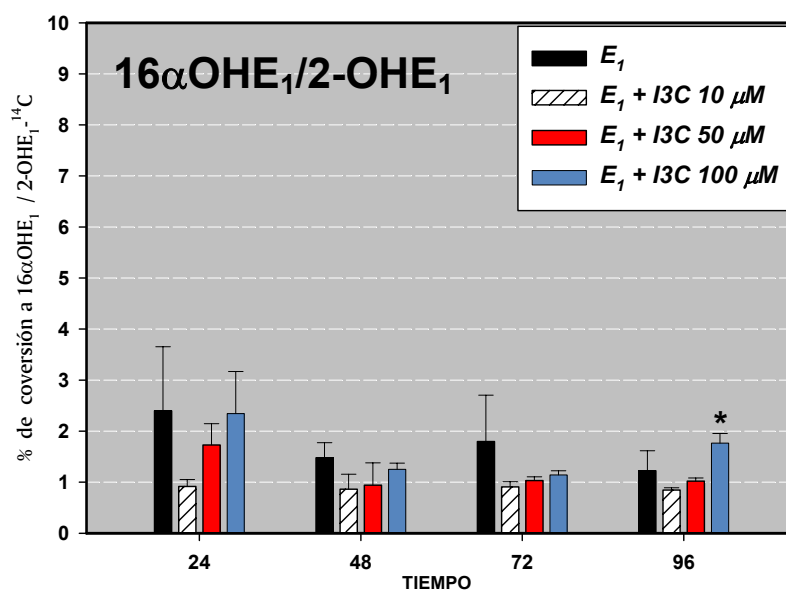


Figura 12. Bioconversión de E_1 a 16 α OHE₁/2-OHE₁ en las células MCF-7, en ausencia y presencia de I3C 10, 50 y 100 μM , por diferentes tiempos de incubación. Cada barra representa la media $\pm$ la desviación estándar de tres experimentos realizados por triplicado. Los asteriscos representan diferencias estadísticas ($p < 0.05$) con respecto al control (en ausencia de I3C).

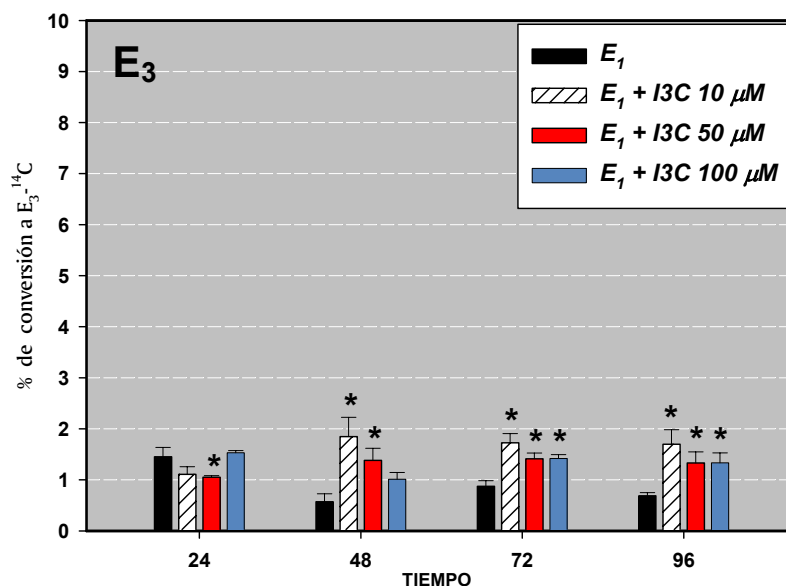


Figura 13. Bioconversión de E_1 a E_3 en las células MCF-7, en ausencia y presencia de I3C 10, 50 y 100 μM , por diferentes tiempos de incubación. Cada barra representa la media $\pm$ la desviación estándar de tres experimentos realizados por triplicado. Los asteriscos representan diferencias estadísticas ($p < 0.05$) con respecto al control (en ausencia de I3C).

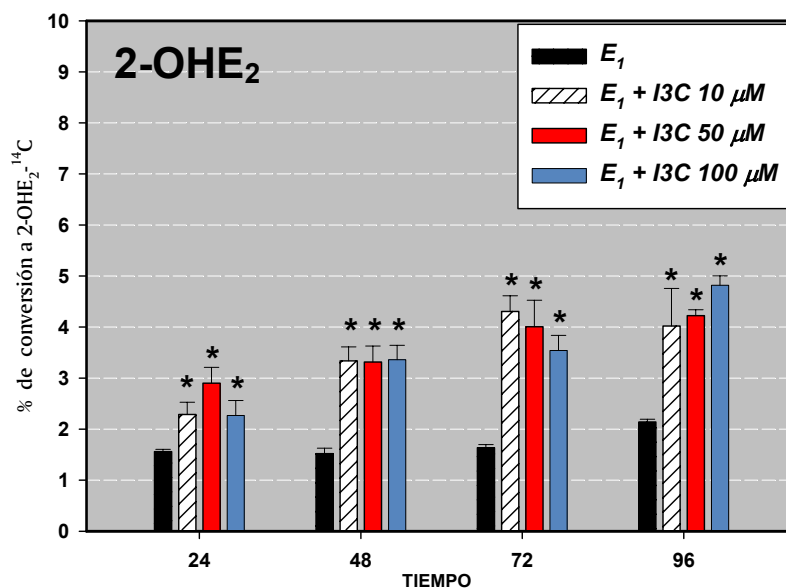


Figura 14. Bioconversión de E_1 a 2-OHE₂ en las células MCF-7, en ausencia y presencia de I3C 10, 50 y 100 μM , por diferentes tiempos de incubación. Cada barra representa la media $\pm$ la desviación estándar de tres experimentos realizados por triplicado. Los asteriscos representan diferencias estadísticas ($p < 0.05$) con respecto al control (en ausencia de I3C).

Metabolismo de E_1 - ^{14}C en presencia de DIM en células MCF-7

La presencia de diferentes concentraciones de DIM en las incubaciones de E_1 - ^{14}C en las células MCF-7, disminuye la formación de E_2 , producto principal de bioconversión, con respecto a los controles, a partir de las 48 h de incubación [Figura 15]. Por otra parte, la presencia de DIM no modificó la bioconversión de E_1 - ^{14}C a los metabolitos $16\alpha OHE_1/2-OHE_1$ [Figura 16]. La formación de E_3 fue menor al 2% en todas las concentraciones de DIM y se observó un ligero incremento a partir de las 48 h de incubación [Figura 17]. La biotransformación de E_1 - ^{14}C a $2-OHE_2$ se incrementó notablemente con las concentraciones de 10 y 50 μM en función del tiempo de incubación, sin embargo, a la concentración de 100 μM la formación de $2-OHE_2$ fue igual a la observada en las células control [Figura 18].

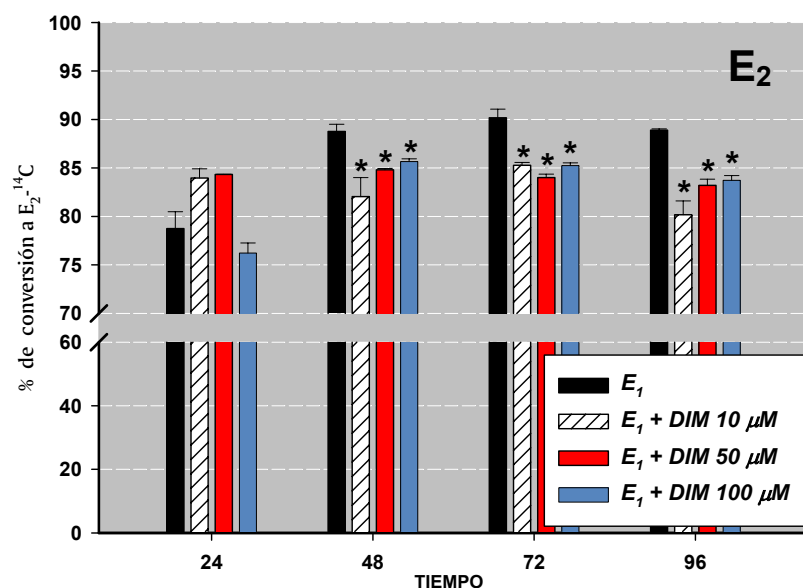


Figura 15. Bioconversión de E_1 a E_2 en las células MCF-7, en ausencia y presencia de DIM 10, 50 y 100 μM , por diferentes tiempos de incubación. Cada barra representa la media $\pm$ la desviación estándar de tres experimentos realizados por triplicado. Los asteriscos representan diferencias estadísticas ($p < 0.05$) con respecto al control (en ausencia de DIM).

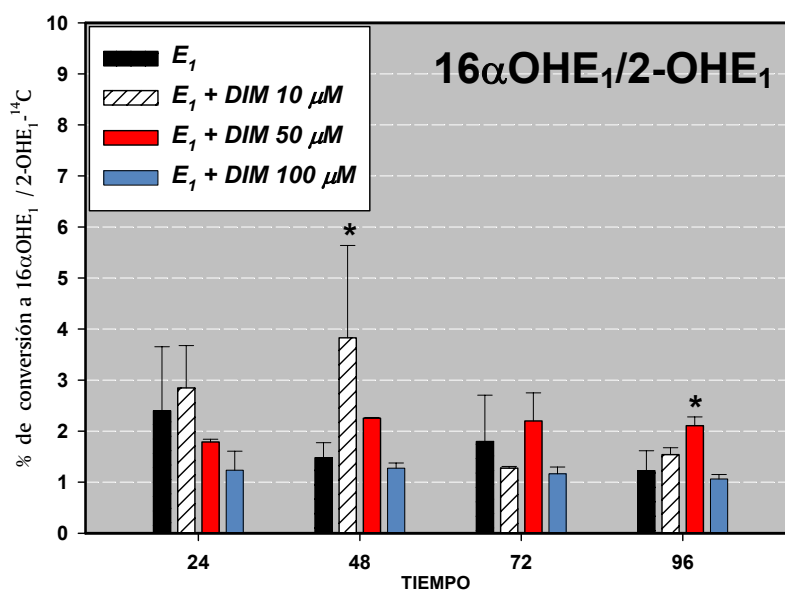


Figura 16. Bioconversión de E_1 a $16\alpha OHE_1/2-OHE_1$ en las células MCF-7, en ausencia y presencia de DIM 10, 50 y 100 μM , por diferentes tiempos de incubación. Cada barra representa la media $\pm$ la desviación estándar de tres experimentos realizados por triplicado. Los asteriscos representan diferencias estadísticas ($p < 0.05$) con respecto al control (en ausencia de DIM).

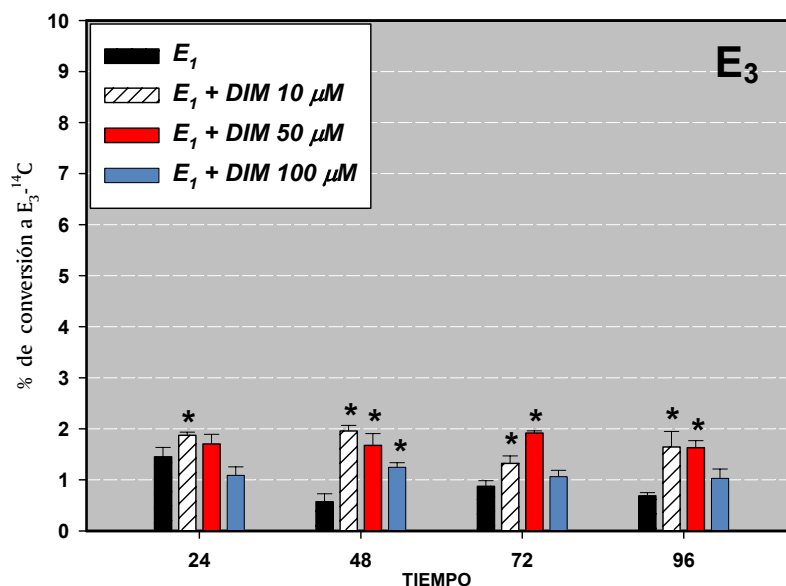


Figura 17. Bioconversión de E_1 a E_3 en las células MCF-7, en ausencia y presencia de DIM 10, 50 y 100 μM , por diferentes tiempos de incubación. Cada barra representa la media $\pm$ la desviación estándar de tres experimentos realizados por triplicado. Los asteriscos representan diferencias estadísticas ($p < 0.05$) con respecto al control (en ausencia de DIM).

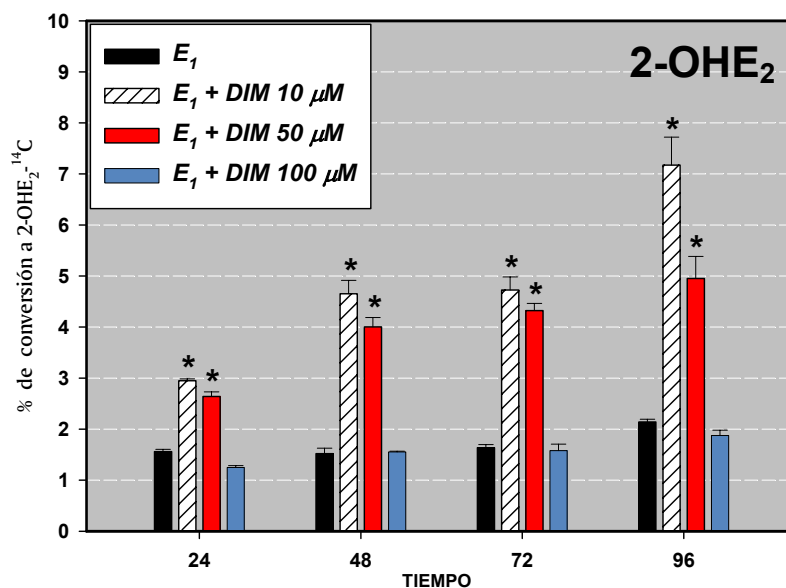
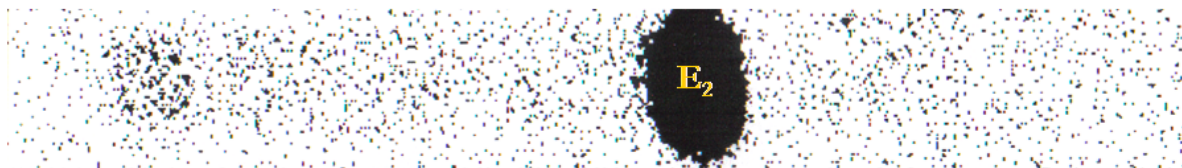


Figura 18. Bioconversión de E_1 a 2-OHE₂ en las células MCF-7, en ausencia y presencia de DIM 10, 50 y 100 μM , por diferentes tiempos de incubación. Cada barra representa la media $\pm$ la desviación estándar de tres experimentos realizados por triplicado. Los asteriscos representan diferencias estadísticas ($p < 0.05$) con respecto al control (en ausencia de DIM).

INCUBACIONES CON E_2 - ^{14}C

Controles

El análisis de la placa de cromatografía de los controles en ausencia de células, mostró únicamente una zona radiactiva correspondiente al sustrato E_2 - ^{14}C incubado.



El análisis del perfil metabólico del E_2 - ^{14}C en las células MCF-7 demostró un bajo porcentaje de bioconversión de E_2 (<10%). La E_1 es el mayor producto formado, en función del tiempo de incubación. La formación de los metabolitos 16α OHE₁/2-OHE₁ fue menor al 1.5% y no varió con respecto al tiempo de incubación. La bioconversión de E_2 - ^{14}C a E_3 fue menor al 2%, mientras que la formación de 2-OHE₂ fue de 1.33% y de 1.92% a las 24 h y 96 h respectivamente en las condiciones experimentales utilizadas.

Metabolismo de E_2 - ^{14}C en presencia de I3C en células MCF-7

Los resultados del metabolismo de E_2 - ^{14}C en presencia de diferentes concentraciones de I3C, demostraron que en todas las concentraciones utilizadas el principal producto de formación fue E_1 [Figura 19]. Por otra parte, no existió diferencia significativa ($p>0.05$) con respecto a los controles en la formación de $16\alpha OHE_1/2-OHE_1$ al incubar las células con las diferentes concentraciones del indol [Figura 20]. La formación de E_3 a partir de E_2 - ^{14}C en presencia de I3C, fue menor al 2% y no presenta diferencias significativas con respecto a los controles, en los diferentes tiempos de incubación [Figura 21]. La formación de $2-OHE_2$, fue significativamente mayor con respecto a los controles y se incrementó a partir de las 48 h [Figura 22].

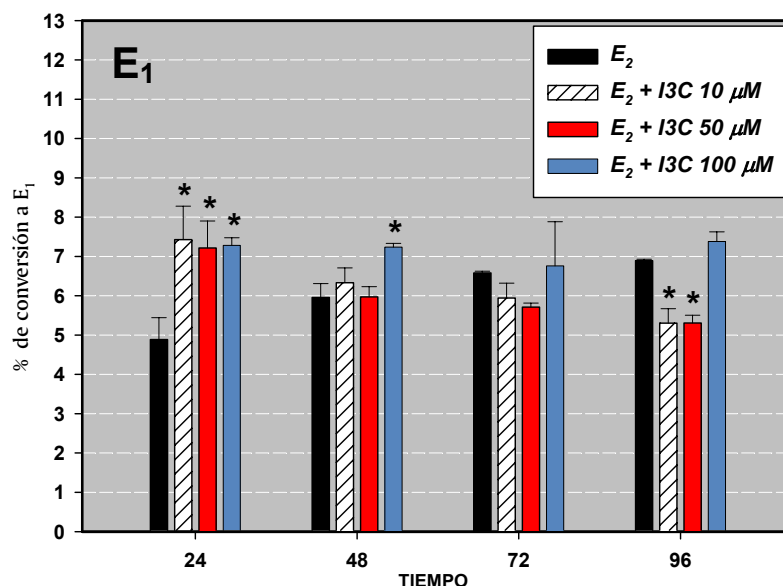


Figura 19. Bioconversión de E_2 a E_1 en las células MCF-7, en ausencia y presencia de I3C 10, 50 y 100 μM , por diferentes tiempos de incubación. Cada barra representa la media $\pm$ la desviación estándar de tres experimentos realizados por triplicado. Los asteriscos representan diferencias estadísticas ($p < 0.05$) con respecto al control (en ausencia de I3C).

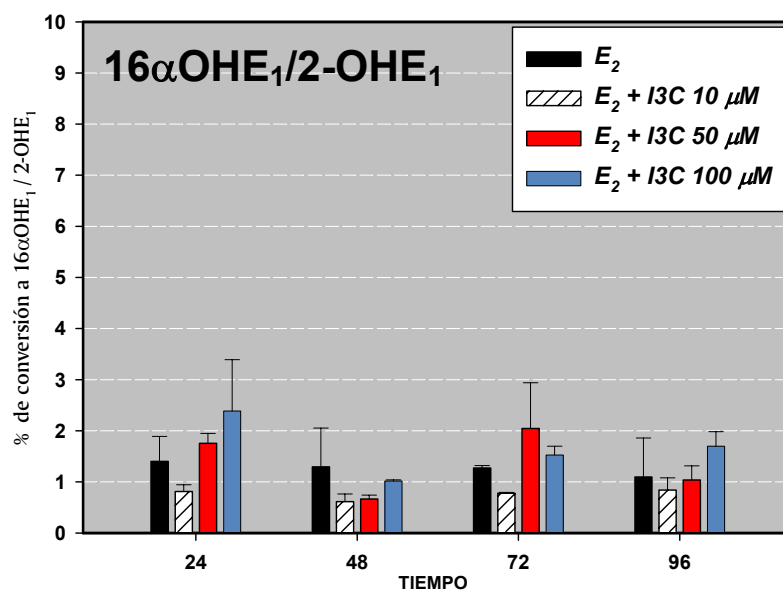


Figura 20. Bioconversión de E_2 a 16 α OHE₁/2-OHE₁ en las células MCF-7, en ausencia y presencia de I3C 10, 50 y 100 μM , por diferentes tiempos de incubación. Cada barra representa la media $\pm$ la desviación estándar de tres experimentos realizados por triplicado. No se presentan diferencias estadísticas ($p > 0.05$) con respecto al control (en ausencia de I3C).

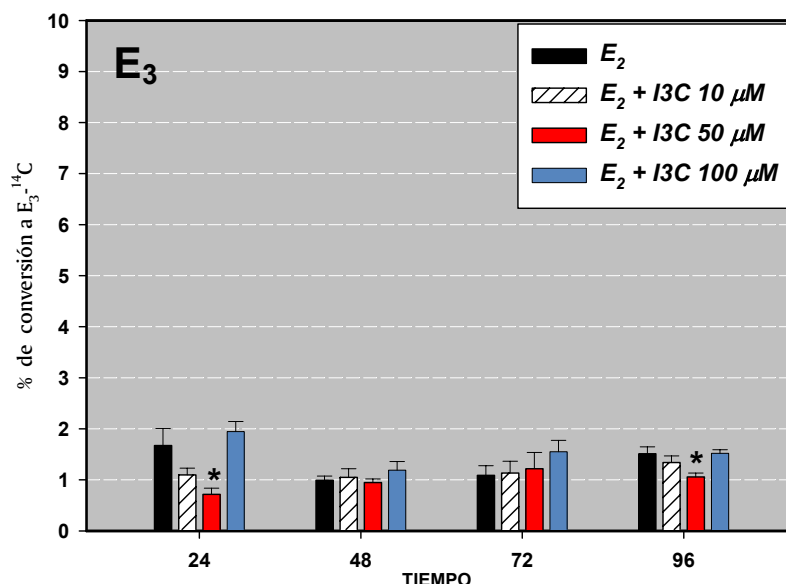


Figura 21. Bioconversión de E₂ a E₃ en las células MCF-7, en ausencia y presencia de I3C 10, 50 y 100 μM, por diferentes tiempos de incubación. Cada barra representa la media ± la desviación estándar de tres experimentos realizados por triplicado. Los asteriscos representan diferencias estadísticas ($p < 0.05$) con respecto al control (en ausencia de I3C).

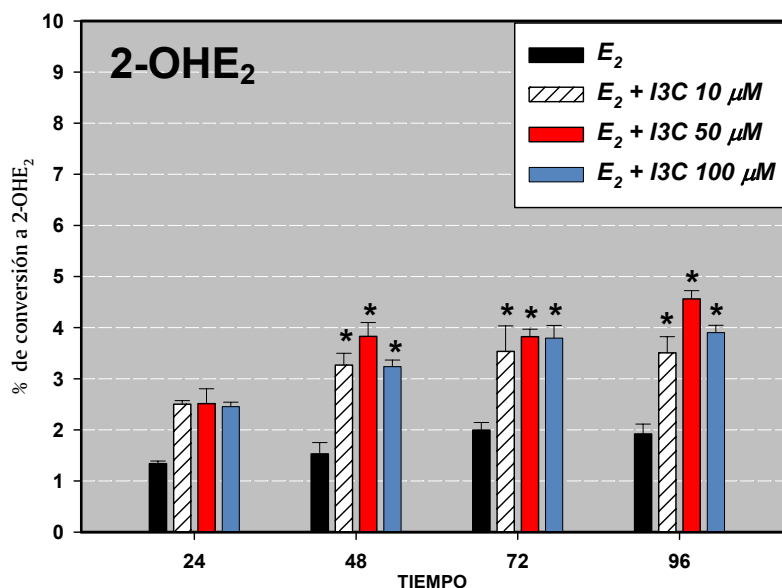


Figura 22. Bioconversión de E₂ a 2-OHE₂ en las células MCF-7, en ausencia y presencia de I3C 10, 50 y 100 μM, por diferentes tiempos de incubación. Cada barra representa la media ± la desviación estándar de tres experimentos realizados por triplicado. Los asteriscos representan diferencias estadísticas ($p < 0.05$) con respecto al control (en ausencia de I3C).

Metabolismo de E_2 - ^{14}C en presencia de DIM en células MCF-7

El análisis de las incubaciones con E_2 - ^{14}C en presencia de diferentes concentraciones de DIM, mostró que el producto principal de conversión fue E_1 . La mayor conversión de E_1 se observó a la concentración de 100 μM de DIM, siendo significativamente mayor a la de los controles y el incremento fue en función del tiempo de incubación [Figura 23]. La biotransformación de E_2 - ^{14}C a $16\alpha OHE_1/2-OHE_1$ no varió en presencia de DIM [Figura 24]. La formación de E_3 fue menor al 2% a todas las concentraciones de DIM y no cambió en función del tiempo de incubación. La biotransformación de E_2 - ^{14}C a $2-OHE_2$ se incrementó notablemente en función del tiempo de incubación con las concentraciones de 10 y 50 μM de DIM, sin embargo, a la concentración de 100 μM la formación de $2-OHE_2$ fue igual a la observada en los controles [Figura 26].

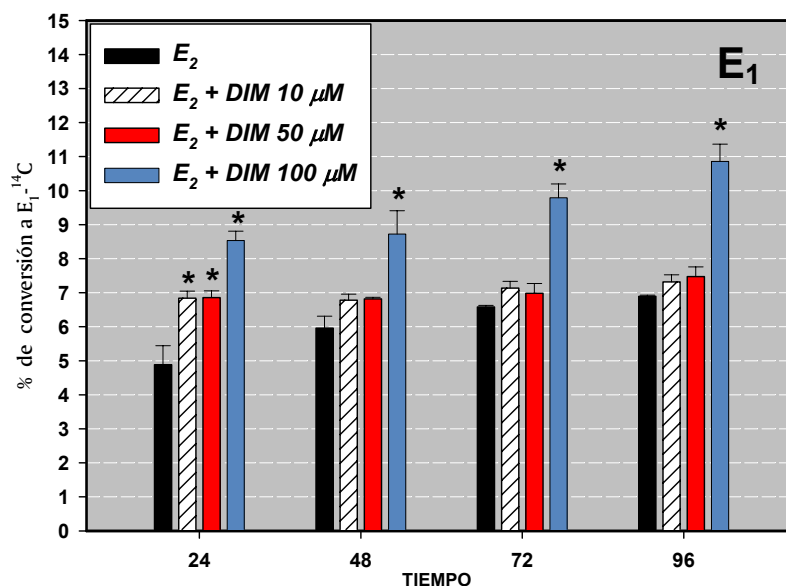


Figura 23. Bioconversión de E_2 a E_1 en las células MCF-7, en ausencia y presencia de DIM 10, 50 y 100 μM , por diferentes tiempos de incubación. Cada barra representa la media $\pm$ la desviación estándar de tres experimentos realizados por triplicado. Los asteriscos representan diferencias estadísticas ($p < 0.05$) con respecto al control (en ausencia de DIM).

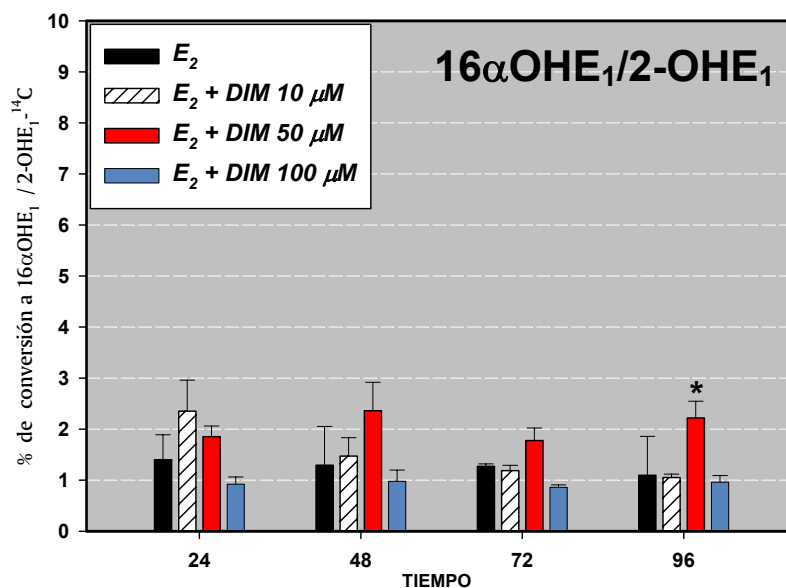


Figura 24. Bioconversión de E_2 a $16\alpha OHE_1/2-OHE_1$ en las células MCF-7, en ausencia y presencia de DIM 10, 50 y 100 μM , por diferentes tiempos de incubación. Cada barra representa la media $\pm$ la desviación estándar de tres experimentos realizados por triplicado. Los asteriscos representan diferencias estadísticas ($p < 0.05$) con respecto al control (en ausencia de DIM).

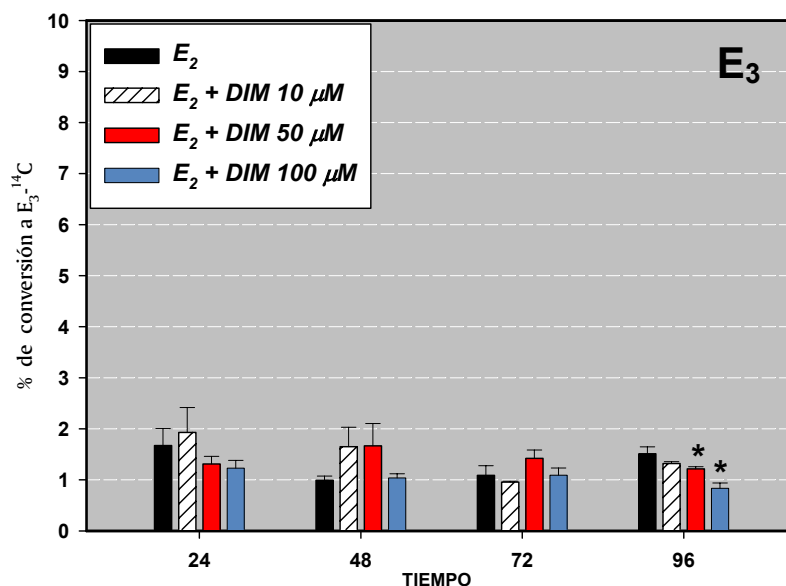


Figura 25. Bioconversión de E_2 a E_3 en las células MCF-7, en ausencia y presencia de DIM 10, 50 y 100 μM , por diferentes tiempos de incubación. Cada barra representa la media $\pm$ la desviación estándar de tres experimentos realizados por triplicado. Los asteriscos representan diferencias estadísticas ($p < 0.05$) con respecto al control (en ausencia de DIM).

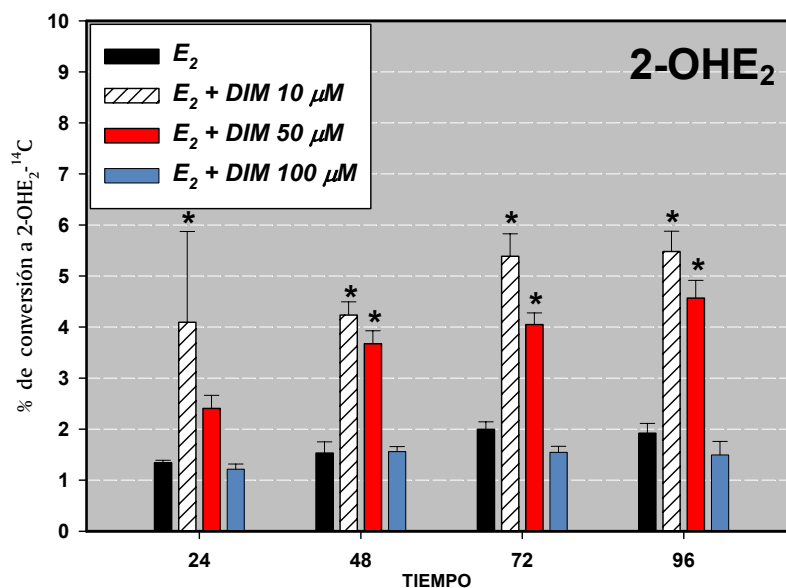


Figura 26. Bioconversión de E_2 a 2-OHE₂ en las células MCF-7, en ausencia y presencia de DIM 10, 50 y 100 μM , por diferentes tiempos de incubación. Cada barra representa la media $\pm$ la desviación estándar de tres experimentos realizados por triplicado. Los asteriscos representan diferencias estadísticas ($p < 0.05$) con respecto al control (en ausencia de DIM).

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que en la línea celular de carcinoma mamario humano MCF-7, el principal producto del metabolismo de la E_1 - ^{14}C es el E_2 , ya que desde las 24 horas de incubación más del 80% de la E_1 - ^{14}C incubada es biotransformada a E_2 [Figura 11], mientras que en las incubaciones de E_2 - ^{14}C , solo un 10% del esteroide incubado es metabolizado a E_1 y a compuestos hidroxilados [Figura 12]. Esto sugiere que la orientación metabólica de los estrógenos en esta línea celular de cáncer mamario está preferentemente orientada hacia la formación del E_2 . Estos resultados son congruentes con reportes en la literatura de la sobre-expresión de la enzima 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 1 (17 β -HSD I) en líneas celulares de cáncer mamario [Purohit y col. 2006], la cual selectivamente transforma E_1 a E_2 [Luu-The 2001]. En células de cáncer de mama dependientes de estrógenos, como lo son las células MCF-7, la sobre-expresión de esta enzima permite tener una mayor formación de E_2 disponible para el continuo crecimiento y desarrollo celular.

Los resultados de incubar las células MCF-7 con E_1 - ^{14}C y E_2 - ^{14}C en presencia de diferentes concentraciones de I3C muestran claramente que este indol tiene la capacidad de incrementar la 2-hidroxilación de los estrógenos, ya que, desde las 24 horas de incubación, el I3C incrementó la formación de 2-OH E_2 , llegando a duplicar su formación a las 96 horas de incubación en comparación con los controles experimentales [Figura 27], efecto que fue observado a todas las concentraciones de I3C utilizadas. Reportes previos, en diferentes modelos experimentales, han demostrado que el I3C incrementa la expresión del

CYP1A1 [Horn y col. 2002, Kim y Milner 2005, Ociepa-Zawal y col. 2007], enzima responsable de la 2-hidroxilación de los estrógenos, lo cual sugiere que el mecanismo de acción por el cual el indol incrementa la formación del 2-OHE₂ es mediante el incremento de la expresión del *CYP1A1*.

Por otra parte, el DIM a las concentraciones de 10 y 50 µM, fue capaz de incrementar la formación del 2-OHE₂ con respecto a los controles. Esta diferencia se observó desde las 24 horas y aumentó en función del tiempo de incubación. A la concentración de 10 µM de DIM y 96 horas de incubación incrementó casi 4 veces la formación del 2-OHE₂ y más de 2 veces a la concentración de 50 µM cuando el sustrato utilizado fue E₁-¹⁴C. Cuando el sustrato fue E₂-¹⁴C, el incremento fue de 3 veces con 10 µM y más de 2 veces con 50 µM del dímero [Figura 27].

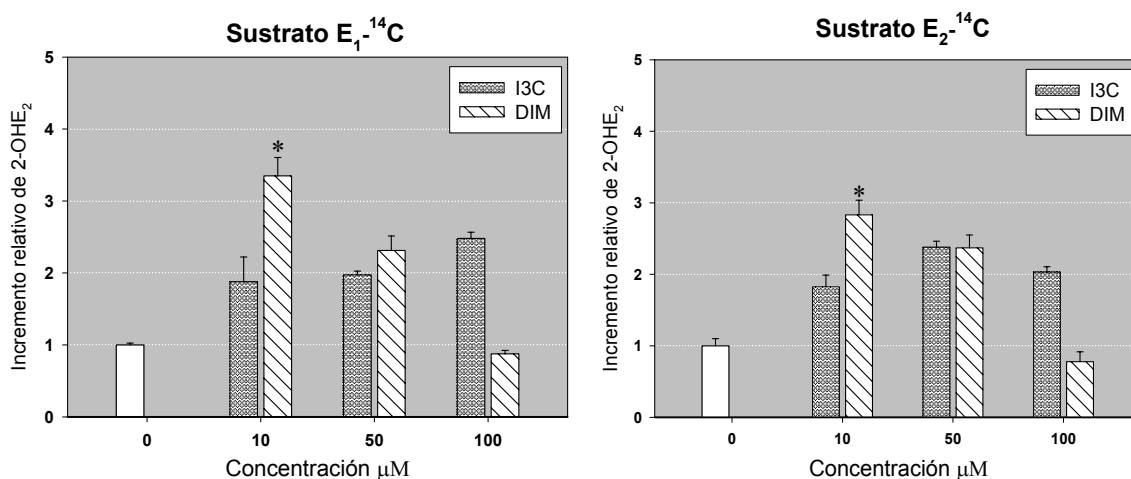


Figura 27. Formación de 2-OHE₂ en ausencia y presencia de 10, 50 y 100 µM de I3C o DIM por un periodo de 96 horas de incubación. El análisis estadístico demuestra que el DIM induce la formación del 2-OHE₂ con mayor potencia que el I3C en la concentración del 10µM, independientemente del sustrato utilizado. * $p < 0.05$ I3C vs DIM.

Interesantemente, en altas concentraciones (100 μM) el DIM no induce el incremento en la formación del 2-OHE₂ con respecto a los controles, sin embargo a la misma concentración del dímero, la bioconversión de E₂-¹⁴C a E₁ fue significativamente mayor que los controles y aumentó en función del tiempo de incubación. Este efecto probablemente es debido a la inhibición de la expresión del *CYP1A1*, por lo que al no metabolizarse a otros compuestos existe un efecto acumulativo de E₁. Estos hallazgos son relevantes ya que se demuestra por primera vez que el DIM a bajas concentraciones (10 y 50 μM) es capaz de incrementar la 2-hidroxilación de los estrógenos, mientras que en altas concentraciones (100 μM) inhibe esta actividad enzimática. El incremento de la 2-hidroxilación del E₂ se correlaciona con los reportes de inducción de la expresión del *CYP1A1* en tratamientos con el dímero [Chen y col. 1998], mientras que la inhibición de este efecto en incubaciones con 100 μM de DIM, concuerda con los reportes donde se sugiere que el dímero es antagonista del AHR e inhibe la inducción del *CYP1A1* [Stresser y col. 1995].

El mecanismo preciso por el cual el DIM presenta distintos efectos en función de la concentración no se conoce, sin embargo, se han reportado varios mecanismos de regulación de la expresión de los genes blanco de AHR. Uno de ellos es una retroalimentación negativa, mediante la expresión de una proteína llamada represor del receptor de los hidrocarburos arilo (AHRR), la cual compite por la dimerización con Arnt, de tal manera que cuando un ligando se une al AHR e induce la expresión del gen blanco, también se expresa el gen del AHRR y compite por la unión a Arnt, disminuyendo la formación del complejo AHR/Arnt [Nakata y col. 2006]. Por otra parte, existe la regulación en los niveles de AHR en las células, mediante ubiquitinización y degradación del receptor

por la vía del proteosoma 26S [Ma y Baldwin 2000]. Otro mecanismo de regulación involucra al dominio de transactivación ubicado en la región C-terminal del AHR, a la cual se unen proteínas activadoras o represoras regulando la actividad transcripcional de AHR/Arnt [Ma 2001]. Estos mecanismos de regulación parecen ser comunes para varios genes blanco del AHR incluyendo al del CYP1A1. Finalmente, se ha reportado que el DIM puede tener actividad antagonista con el AHR, inhibiendo la expresión del *CYP1A1*, mediante la unión con el AHR. En los experimentos realizados por Hestermann y Brown [2003] se observa que el DIM es capaz de activar al AHR, ser translocado al núcleo junto con Arnt, unirse al DNA y reclutar a proteínas coactivadoras como p160, pero es incapaz de reclutar a las histona-acetil transferasas (HATs) para que permitan que la RNA polimerasa II inicie la transcripción del *CYP1A1*.

Los distintos efectos observados con diferentes concentraciones del DIM utilizadas en este estudio, confirman y amplían reportes previos de la literatura que describen efectos de inducción/inhibición de la expresión del *CYP1A1*, sugiriendo que el DIM puede actuar como un modulador de la transcripción de esta enzima, siendo relevante su concentración para inducir o inhibir el efecto ejercido.

En conclusión, con los resultados obtenidos en este trabajo se demuestra que en la línea celular de cáncer mamario humano estrógeno-dependiente MCF-7, tanto el I3C y como el DIM, son capaces de incrementar la formación de compuestos 2-hidroxilados, los cuales disminuyen el riesgo a cáncer mamario, siendo el DIM el compuesto con mayor potencia para incrementar la formación

del 2-OHE₂. Estos resultados plantean la posibilidad de contar con una estrategia que favorezca la bioconversión de estrógenos a metabolitos 2-hidroxilados de baja potencia biológica, disminuyendo uno de los factores de riesgo a cáncer mamario.

PERSPECTIVAS

Actualmente se realizan experimentos sobre la expresión del gen de la enzima responsable de la 2-hidroxilación de los estrógenos CYP1A1, en presencia de las diferentes concentraciones de I3C y DIM, con la finalidad de dilucidar el posible mecanismo por el cual I3C/DIM inducen la formación del 2-OHE₂ en la línea celular de cáncer mamario humano estrógeno-dependiente MCF-7.

REFERENCIAS

Adlercreutz H, Gorbach SL, Goldin BR, Woods MN, Dwyer JT, Hämäläinen E 1994. Estrogen metabolism and excretion in oriental and caucasian women. *Journal of the National Cancer Institute* 86:1076-1082.

Aggarwal BB, Ichikawa H 2005. Molecular targets and anticancer potential of indole-3-carbinol and its derivatives. *Cell Cycle* 4:1201-1215.

Bradlow HL, Hershcopf RJ, Martucci CP, Fishman J 1985. Estradiol 16 α -hydroxylation in the mouse correlates with mammary tumor incidence and presence of murine mammary tumor virus: A possible model for the hormonal etiology of breast cancer in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 82:6295-6299

Bonnesen C, Eggleston IM, Hayes JD 2001. Dietary indoles and isothiocyanates that are generated from cruciferous vegetables can both stimulate apoptosis and confer protection against DNA damage in human colon cell lines. *Cancer Research* 61:6120-6130.

Bucala R, Fishman J, Cerami A 1982. Formation of covalent adducts between cortisol and 16 α -hydroxyestrone and protein: Possible role in the pathogenesis of cortisol toxicity and systemic lupus erythematosus. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 79:3320-3324.

Chang C-Y, Puga A 1998. Constitutive activation of the aromatic hydrocarbon receptor. *Molecular and Cellular Biology* 18:525-535.

Chang X, Tou JC, Hong C, Kim H-A, Riby JE, Firestone GL, Bjeldanes LF 2005. **3,3'-diindolylmethane inhibits angiogenesis and growth of transplantable human breast carcinoma in athymic mice.** *Carcinogenesis* 26:771-778.

Chang X, Firestone GL, Bjeldanes LF 2006. **Inhibition of growth factor-induced Ras signaling in vascular endothelial cells and angiogenesis by 3,3'-diindolylmethane.** *Carcinogenesis* 27:541-550.

Chen I, Safe S, Bjeldanes LF 1996. **Indole-3-carbinol and diindolylmethane as aryl hydrocarbon (AH) receptor agonists and antagonists in T47D human breast cancer cells.** *Biochemical Pharmacology* 51:1069-1076.

Chen I, McDougal A, Wang F, Safe S 1998. **Aryl hydrocarbon receptor-mediated antiestrogenic and antitumorigenic activity of di-indolylmethane.** *Carcinogenesis* 19:1631-1639.

Chen Y, Xu J, Jhala N, Pawar P, Zhu ZB, Ma L, Byon C-H, McDonald JM 2006. **Fas-mediated apoptosis in cholangiocarcinoma cells is enhanced by 3,3'-diindolylmethane through inhibition of AKT signaling and FLICE-like inhibitory protein.** *The American Journal of Pathology* 169:1833-1842.

Cover CM, Hsieh SJ, Tran SH, Hallden G, Kim GS, Bjeldanes LF, Firestone GL 1998. **Indole-3carbinol inhibits the expression of cyclin-dependent kinase-6 and induces a G₁ cell cycle arrest of human breast cancer cells independent of estrogen receptor signaling.** *Journal of Biological Chemistry* 273:3838-3847.

Cover CM, Hsieh SJ, Cram EJ, Hong C, Riby JE, Bjeldanes LF, Firestone G 1999. Indole-3-carbinol and tamoxifen cooperate to arrest the cell cycle of MCF-7 human breast cancer cells. *Cancer Research* 59:1244-1251.

Cram EJ, Liu BD, Bjeldanes LF, Firestone GL 2001. Indole-3-carbinol inhibits CDK6 expression in human MCF-7 breast cancer cells by disrupting Sp1 transcription factor interactions with a composite element in the *CDK6* gene promoter. *Journal of Biological Chemistry* 276:22332-22340.

D'Amato RJ, Lin CM, Flynn E, Folkman J, Hamel E 1994. 2-methoxyestradiol, an endogenous mammalian metabolite, inhibits tubulin polymerization by interacting at the colchicine site. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91:3964-3968.

Davis CD, Milner JA 2007. Biomarkers for diet and cancer prevention research: Potentials and challenges. *Acta Pharmacologica Sinica* 28:1262-1273.

Dawling S, Roodi N, Mernaugh RL, Wang X, Parl FF 2001. Catechol-*o*-methyltransferase (COMT)-mediated metabolism of catechol estrogens: Comparison of wild-type and variant COMT Isoforms. *Cancer Research* 61:6716-6722.

Dumitrescu RG, Cotarla I 2005. Understanding breast cancer risk – Where do we stand in 2005? *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 9:208-221.

Fahey JW, Zhang Y, Talalay P 1997. Broccoli sprouts: An exceptionally rich source of inducers of enzymes that protect against chemical carcinogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94:10367-10372.

Ferlay J, Bray F, Pisan P, Parkin DM. **Globocan 2002: Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide**. International Agency for Research on Cancer, IARC, <http://www-dep.iarc.fr>.

Firestone GL, Bjeldanes LF 2003. **Indole-3-carbinol and 3,3'-diindolylmethane antiproliferative signaling pathways control cell-cycle gene transcription in human breast cancer cells by regulating promoter-Sp1 transcription factor interactions.** *Journal of Nutrition* 133:2448S-2455S.

Fotsis T, Zhang Y, Pepper M, Adlercreutz H, Montesano R, Nawroth PP, Schweigerer L 1994. **The endogenous oestrogen metabolite 2-methoxyoestradiol inhibits angiogenesis and suppresses tumor growth.** *Nature* 368:237-239.

Garcia HH, Brar GA, Nguyen DHH, Bjeldanes LF, Firestone GL 2005. **Indole-3-carbinol (I3C) inhibits cyclin-dependent kinase-2 function in human breast cancer cells by regulating the size distribution, associated cyclin e forms, and subcellular localization of the CDK2 protein complex.** *Journal of Biological Chemistry* 280:8756-8764.

Ge X, Yannai S, Rennert G, Gruener N, Fares FA 1996. **3,3'-diindolylmethane induces apoptosis in human cancer cells.** *Biochemical and Biophysical Research Communications* 228:153-158.

Gong Y, Sohn H, Xue L, Firestone GL, Bjeldanes LF 2006. **3,3'-diindolylmethane is a novel mitochondrial H⁺-ATP synthase inhibitor that can Induce p21^{Cip1/Waf1}**

expression by induction of oxidative stress in human breast cancer cells. *Cancer Research* 66:4880-4887.

Hamel E, Lin CM, Flynn E, D'Amato RJ 1996. Interactions of 2-methoxyestradiol, an endogenous mammalian metabolite, with unpolymerized tubulin and tubulin polymers. *Biochemistry* 35:1304-1310.

Hestermann EV, Brown M 2003. Agonist and chemopreventative ligands induce differential transcriptional cofactor recruitment by aryl hydrocarbon receptor. *Molecular and Cellular Biology* 23:7920-7925.

Hilakivi-Clarke L, Wang C, Kalil M, Riggins R, Pestell RG 2004. Nutritional modulation of the cell cycle and breast cancer. *Endocrine-Related Cancer* 11:603-622.

Hogenesch JB, Chan WK, Jackiw VH, Brown RC, Gu Y-Z, Pray-Grant M, Perdew GH, Bradfield CA 1997. Characterization of a subset of the basic-helix-loop-helix-PAS superfamily that interacts with components of the dioxin signaling pathway. *Journal of Biological Chemistry* 272:8581-8593.

Hong C, Firestone GL, Bjeldanes LF 2002. Bcl-2 family-mediated apoptotic effects of 3,3'-diindolylmethane (DIM) in human breast cancer cells. *Biochemical Pharmacology* 63:1085-1097.

Hong C, Kim H-A, Firestone GL, Bjeldanes LF 2002. 3,3-diindolylmethane (DIM) induces a G₁ cell cycle arrest in human breast cancer cells that is accompanied by Sp1-mediated activation of p21^{WAF1/CIP1} expression. *Carcinogenesis* 23:1297-1305.

Horn TL, Reichert MA, Bliss RL, Malejka-Giganti D 2002. **Modulations of P450 mRNA in liver and mammary gland and P450 activities and metabolism of estrogen in liver by treatment of rats with indole-3-carbinol.** *Biochemical Pharmacology* 64:393-404.

Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática, INEGI. **Información sobre tumores malignos, Estadísticas Vitales, Base de datos 2008.**

Jefcoate CR, Liehr JG, Santen RJ, Sutter TR, Yager JD, Yue W, Santner SJ, Tekmal R, Demers L, Pauley R, Naftolin F, Mor G, Berstein L 2000. **Chapter 5: Tissue-specific synthesis and oxidative metabolism of estrogens.** *Journal of the National Cancer Institute Monographs* 27:95-111.

Jong MM, Nolte IM, Meerman GJ, Van der Graaf WTA, Oosterwijk JC, Kleibeuker JH, Schaapveld M, Vries EG 2002. **Genes other than *BRCA1* and *BRCA2* involved in breast cancer susceptibility.** *Journal of Medical Genetics* 39:225-242.

Khan SA, Bhandare D, Chatterton RT 2005. **The local hormonal environment and related biomarkers in the normal breast.** *Endocrine-Related Cancer* 12:497-510.

Kim SH, Lee S-U, Kim MH, Kim BT, Min YK 2005. **Mitogenic estrogen metabolites alter the expression of 17 β -estradiol-regulated proteins including heat shock proteins in human MCF-7 breast cancer cells.** *Molecules and Cells* 20:378-384.

Kim YS, Milner JA 2005. **Targets for indole-3-carbinol in cancer prevention.** *Journal of Nutritional Biochemistry* 16:65-73.

Klauber N, Parangi S, Flynn E, Hamel E, D'Amato RJ 1997. **Inhibition of angiogenesis and breast cancer in mice by the microtubule inhibitors 2-methoxyestradiol and taxol.** *Cancer Research* 57:81-86.

Koehler KF, Helguero LA, Haldosén L-A, Warner M and Gustafsson J-Å 2005. **Reflections on the discovery and significance of estrogen receptor β .** *Endocrine Reviews* 26:465-478.

Lemus AE, Pérez-Palacios G. **Hormonas esteroides: Metabolismo** 2001. En: JJ Hicks, (Eds.) **Bioquímica.** Mc GrawHill 1ª edición. México, D.F.; pp. 677-684.

Lemus AE, Santillán R, Damián-Matsumura P, García GA, Grillasca I, Pérez-Palacios G 2001. **In vitro metabolism of gestodene in target organs: Formation of a-ring reduced derivatives with oestrogenic activity.** *European Journal of Pharmacology* 417:249-256.

Lewis JS, Thomas TJ, Klinge CM, Gallo MA, Thomas T 2001. **Regulation of cell cycle and cyclins by 16 α -hydroxyestrone in MCF-7 breast cancer cells.** *Journal of Molecular Endocrinology* 27:293-307.

Lewis JS, Thomas TJ, Pestell RG, Albanese C, Gallo MA, Thomas T 2005. **Differential effects of 16 α -hydroxyestrone and 2-methoxyestradiol on cyclin d1 involving the transcription factor ATF-2 in MCF-7 breast cancer cells.** *Journal of Molecular Endocrinology* 34:91-105.

Lorincz AM, Sukumar S 2006. Molecular links between obesity and breast cancer. *Endocrine-Related Cancer* 13:279-292.

Luu-The V 2001. Analysis and characteristics of multiple types of human 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 76:143-151.

Ma Q 2001. Induction of *CYP1A1*. The AhR/DRE paradigm: trascription, receptor regulation, and expanding biological roles. *Current Drug Metabolism* 2:149-164.

Ma Q, Baldwin KT 2000. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin-induced degradation of aryl hydrocarbon receptor (AHR) by the ubiquitin-proteasome pathway. *Journal of Biological Chemistry* 275:8432-8438.

Martínez-Tlahuel JL, Arce C, Lara FU 2006. Cáncer de mama en el hombre. *Revista del Instituto Nacional de Cancerología de México* 1:201-210.

Milner J 2004. Molecular targets for bioactive food components. *Journal of Nutrition* 134:2492S-2498S.

Mimura J, Fujii-Kuriyama Y 2003. Functional role of Ahr in the expression of toxic effects by TCDD. *Biochimica et Biophysica Acta* 1619:263-268.

Muti P, Bradlow HL, Micheli A, Krogh V, Freudenheim JL, Schünemann HJ, Stanulla M, Yang J, Sepkovic DW, Trevisan M, Berrino F 2000. Estrogen

metabolism and risk of breast cancer: A prospective study of the 2:16 alpha-hydroxyestrone ratio in premenopausal and postmenopausal women. *Epidemiology* 11:635-640.

Nagata K, Yamazoe Y 2002. Genetic polymorphism of human cytochrome P450 involved in drug metabolism. *Drug Metabolism Pharmacokinetics* 17:167-189.

Nakata K, Tanaka Y, Nakano T, Adachi T, Tanaka H, Kaminuma T, Ishikawa T 2006. Nuclear receptor-mediated transcriptional regulation in phase I, II and III xenobiotic metabolizing systems. *Drug Metabolism Pharmacokinetics* 21:437-457.

Nebert DW, Dalton TP, Okey AB, Gonzales FJ 2004. Role of aryl hydrocarbon receptor-mediated induction of the CYP1 enzymes in environmental toxicity and cancer. *Journal of Biological Chemistry* 279:23847-23850.

Ociepa-Zawal M, Rubiř B, Łaciński M, Trzeciak WH 2007. The effect of indole-3-carbinol on the expression of *CYP1A1*, *CYP1B1* and *AHR* genes and proliferation of mcf-7 cells. *Acta Biochimica Polonica* 54:113-117.

Poland A, Glover E, Kende AS 1976. Stereospecific, high affinity binding of 2,3,7,8- tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin by hepatic cytosol. *Journal of Biological Chemistry* 251:4936-4946.

Purohit A, Tutill HJ, Day JM, Chander SK, Lawrence HR, Allan GM, Fischer DS, Vicker N, Newman SP, Potter BVL, Reed MJ 2006. The regulation and inhibition

of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase in breast cancer. *Molecular and Cellular Endocrinology* 248:199-203.

Rahman KMW, Sarkar FH 2005. Inhibition of nuclear translocation of nuclear factor- κ b contributes to 3,3'-diindolylmethane-induced apoptosis in breast cancer cells. *Cancer Research* 65:364-371.

Rahman KMW, Li Y, Wang Z, Sarkar SH, Sarkar FH 2006. Gene expression profiling revealed survivin as a target of 3,3'-diindolylmethane-induced cell growth inhibition and apoptosis in breast cancer cells. *Cancer Research* 66:4952-4960.

Reed MJ, Owen AM, Lai LC, Coldham NG, Ghilchik MW, Shaikh NA, James VH 1989. *In situ* oestrone synthesis in normal breast and breast tumor tissues: Effect of treatment with 4-hydroxyandrostenedione. *International Journal of Cancer* 44:233-237.

Ricker JL, Chen Z, Yang XP, Pribluda VS, Swartz GM, Waes CV 2004. 2-metoxiestradiol inhibits hypoxia-inducible factor 1 α , tumor growth, and angiogenesis and augments paclitaxel efficacy in head and neck squamous cell carcinoma. *Clinical Cancer Research* 10:8665-8673.

Russo J, Fernandez SV, Russo PA, Fernbaugh R, Sheriff FS, Lareef HM, Garber J. Russo IH 2006. 17-beta-estradiol induces transformation and tumorigenesis in human breast epithelial cells. *The FASEB Journal* 20:1622-1634.

Russo IH, Russo J 1996. Mammary gland neoplasia in long-term rodent studies. *Environmental Health Perspectives* 104:938-967.

Russo J, Russo IH 2006. The role of estrogen in the initiation of breast cancer. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 102:89-96.

Safe SH 1998. Interactions between hormones and chemicals in breast cancer. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 38:121-158.

Sarkar FH, Rahman KMW, Li Y 2003. Bax translocation to mitochondria is an important event in inducing apoptotic cell death by indole-3-carbinol (I3C) treatment of breast cancer cells. *Journal of Nutrition* 133:2434S-2439S.

Savino III JA, Evans JF, Rabinowitz D, Auburn KJ, Carter TH 2006. Multiple, disparate roles for calcium signaling in apoptosis of human prostate and cervical cancer cells exposed to diindolylmethane. *Molecular Cancer Therapeutics* 5:556-563.

Schneider J, Huh MM, Bradlow HL, Fishman J 1984. Antiestrogen action of 2-hydroxyestrone on MCF-7 human breast cancer cells. *Journal of Biological Chemistry* 259:4840-4845.

Shimada T 2006. Xenobiotic-metabolizing enzymes involved in activation and detoxification of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons. *Drug Metabolism Pharmacokinetics* 21:257-276.

Stresser DM, Bailey GS, Williams DE, Bjeldanes LF 1995. The anticarcinogen 3,3'-diindolylmethane is an inhibitor of cytochrome P-450. *Journal of Biochemical Toxicology* 10:191–201.

Swaneck GE, Fishman J 1988. Covalent binding of the endogenous estrogen 16 α -hydroxyestrone to estradiol receptor in human breast cancer cells: Characterization and intranuclear localization. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 85:7831-7835.

Ursin G, London S, Stanczyk FZ, Gentzschein E, Paganini-Hill A, Ross RK, Pike MC 1999. Urinary 2-hydroxyestrone/16 α -hydroxyestrone ratio and risk of breast cancer in postmenopausal women. *Journal of the National Cancer Institute* 91:1067–1072.

Ursin G, London S, Yang D, Tseng C-C, Pike MC, Bernstein L, Stanczyk FZ, Gentzschein E 2002. Urinary 2-hydroxyestrone/16 α -hydroxyestrone ratio and family history of breast cancer in premenopausal women. *Breast Cancer Research and Treatment* 72:139–143.

Vrzal R, Ulrichová J, Dvorá Z 2004. Aromatic hydrocarbon receptor status in the metabolism of xenobiotics under normal and pathophysiological conditions. *Biomedical Papers* 148:3-10.

Werck-Reichhart D, Feyereisen R 2000. Cytochromes P450: A success story. *Genome Biology* 1:reviews3003.1-3003.9.

Yager JD, Liehr JG 1996. **Molecular mechanisms of estrogen carcinogenesis.** *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 36:203-232.

Zhang J, Hsu JC, Kinseth MA, Bjeldanes LF, Firestone GL 2003. **Indole-3-carbinol induce a G1 cell cycle arrest and inhibits prostate-specific antigen production in human LNCaP prostate carcinoma cells.** *Cancer* 98:2511-2520.

Zhang Y, Talalay P, Cho C-G, Posner GH 1992. **A major inducer of anticarcinogenic protective enzymes from broccoli: Isolation and elucidation of structure.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 89:2399-2403.

Zhu BT, Conney AH 1998. **Functional role of estrogen metabolism in target cells: Review and perspectives.** *Carcinogenesis* 19:1-27.

Zhu BT, Lee AJ 2005. **NADPH-dependent metabolism of 17 β -estradiol and estrone to polar and nonpolar metabolites by human tissues and cytochrome P450 isoforms.** *Steroids* 70:225-244.