



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
MAESTRÍA EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

**T E S I S
PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

**"REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LA ANGIOGENINA
EN EL CÁNCER MAMARIO"**

Presentada:

Biól. Exp. Erika Karina Ruvalcaba Paredes

Director de Tesis:

Doctor Pablo Gustavo Damián Matsumura

Asesoras:

Doctora Mina Königsberg Fainstein

Doctora Edith Lucia Salazar Esquivel

México, D. F., Junio del 2008

COMITÉ TUTORAL

DIRECTOR DE TESIS:

Doctor Pablo Gustavo Damián Matsumura,
Profesor Titular C, Tiempo Completo.
Laboratorio de Endocrinología Molecular
Departamento de Biología de la Reproducción, UAM-I.
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa
pgdm@xanum.uam.mx

ASESORA:

Doctora Mina Königsberg Fainstein
Profesor Titular C, Tiempo Completo.
Laboratorio de Bioenergética y Envejecimiento Celular
Departamento de Ciencias de la Salud, UAM-I.
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa
mkf@xanum.uam.mx

ASESORA:

Doctora Edith Lucía Salazar Esquivel
Investigadora Titular.
Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Endocrinas.
Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional, Siglo XXI, IMSS
dra_edith_salazar@yahoo.com.mx

AGRADECIMIENTOS

A CONACYT

El programa de la Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM-I 309-1) pertenece al Padrón de Posgrados de Excelencia de CONACYT PIFOP-CONACYT-SEP y cuenta con apoyo del mismo Consejo a través del convenio 309-0, con la clave C/PFPN-2002-35-32.

Este trabajo fue realizado en el laboratorio de de Endocrinología Molecular, en el Departamento de Biología de la Reproducción de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, bajo la dirección del Dr. Pablo Gustavo Damián Matsumura. El trabajo de Investigación fue apoyado por el Fondo Institucional para el Fomento de la Ciencia el Fomento de la Tecnología y el Fomento Desarrollo y Consolidación de Científicos y Tecnólogos CONACYT con el No. I-35122.

Quiero expresar que recibí apoyo de la beca otorgada por CONACYT con el número de registro 192992.

MIEMBROS DEL JURADO

PRESIDENTA:

Dra. Minerva Muñoz Gutiérrez
Departamento de Biología de la Reproducción
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa
mmg@xanum.uam.mx

VOCAL:

Doctora Edith Lucia Salazar Esquivel
Hospital de Especialidades,
Centro Medico Nacional, Siglo XXI, IMSS
dra_edith_salazar@yahoo.com.mx

VOCAL:

Dra. Norma Edith López Díaz Guerrero
Departamento de Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa
norm@xanum.uam.mx

SECRETARIA:

Doctora Mina Königsberg Fainstein
Departamento de Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa
mkf@xanum.uam.mx

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: **“REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LA ANGIOGENINA EN EL CÁNCER MAMARIO”**, con fecha _____ de _____ del 2008.

JURADO DE EXAMEN

Presidenta

DRA. MINERVA MUÑOZ GUTIÉRREZ
Departamento de Biología de la Reproducción
División de Ciencias Biológicas y de la Salud. UAM-I.

Vocal

DRA. EDITH LUCIA SALAZAR ESQUIVEL
Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Endocrinas
Hospital de Especialidades. Centro Medico Nacional. Siglo XXI. IMSS.

Vocal

DRA. NORMA EDITH LÓPEZ DÍAZ GUERRERO
Departamento de Ciencias de Salud
División de Ciencias Biológicas y de la Salud. UAM-I.

Secretaria

DRA. MINA KÖNIGSBERG FAINSTEIN
Departamento de Ciencias de Salud
División de Ciencias Biológicas y de la Salud. UAM-I.

*SÓLO UNA COSA TORNA A
UN SUEÑO IMPOSIBLE:
EL MIEDO AL FRACASO*

Paulo Coelho

*Por esta razón este trabajo va dedicado,
a todas las personas que me apoyaron a
seguir luchando para hacer este sueño
realidad.*

AGRADECIMIENTOS

En esta etapa participaron muchas personas cuya presencia ha marcado mi vida, muchas de ellas siguen acompañándome y complaciéndome con su presencia en este recorrido.

Algunas de ellas son imprescindibles, por eso, hoy quiero darle las gracias a mis padres: Hortensia y Fermin, por darme la vida, inculcarme valores y enseñarme a diferenciar el bien del mal; a mis hermanos favoritos: Pame y Sergio, por apoyarme, por hacerme sonreír en los momentos difíciles, por enseñarme a compartir, por sus consejos y además los cuatro me aceptan y me aman como soy. También quiero expresar mi agradecimiento a Carlos, por haber confiando en mí, por estar en los buenos y malos momentos, por enseñarme a crecer y ser más paciente.

Por su apoyo y amor debo decir gracias, a mis tíos: César, Maribel, Yolanda, Lilia, Hilda, Ismael; a mis primos: Octavio, Ana, Guadalupe, Maribel, Blanca, Aidé, Luís, Julieta, Estefany, Fernando; a mis abuelitos: Ma. del Carmen, Ma. Concepción, Francisco y Pedro.

A todas estas personas que me rodean y me halagan con su afecto, haciéndome sonreír con sus gestos y su ternura, muchas gracias, los amo a todos.

Gracias a todos mis amigos: Armando, Viri, Ricardo, Eloir, Cristóbal, Alicia, Ricardo, Laura, Tere, Maricel, Adriana; que de alguna manera han sido parte de mi vida ya sea por hacerme sonreír o hacerme soltar una que otra lágrima, por ocupar el lugar especial que tienen en el mundo y por permitirme ser parte de su mundo por breves o por largos momentos.

Con respecto a mi vida académica, quiero dar las gracias al Dr. Pablo, por que me permitió ser parte de su grupo de investigación, así como ayudarme aterrizar muchas ideas para realizar este proyecto, a la Dra. Mina, por asesorarme y

orientarme con sus sabios consejos, pero sobre todo quiero hacer un enorme reconocimiento a los dos por haber sido mis Maestros durante muchos años.

Gracias a la Dra. Lucy Salazar, la Dra. Minerva Muñoz, la Dra. Norma López, que de una u otra manera colaboraron asesorándome con mi proyecto de investigación, quiero dar un enorme agradecimiento a la Dra. Minerva Muñoz, por haberme brindado la oportunidad de colaborar con ella. A mis compañeros de Laboratorio: Esteban, Carlos, Ana Belen, Leticia, por hacer mi estadía en el más fácil. A mis compañeros de posgrado: Julio A y César B, por que me soportaron y toleraron durante las clases. A mis alumnos: Alex y Rox, por darme la oportunidad de asesorarlos con lo poco o mucho de mis conocimientos.

Por último gracias a todas las personas que fueron parte de este trabajo, las cuales de una u otra manera me dejaron enseñanzas en mi vida.

Hoy me levantaré temprano pensando en lo que tengo que hacer antes de que el reloj marque la media noche.

Depende de mí escoger el tipo de día que tendré hoy.

Puedo protestar por que está lloviendo o agradecer por que las aguas limpian la contaminación.

Puedo estar triste por no tener dinero o sentirme impulsado a mejorar mis propias finanzas, para evitar cualquier desperdicio.

Puedo quejarme por mí propia salud o dar gracias por estar vivo.

Puedo reclamar por que mi país, no me ha permitido tener todo lo que yo quería o puedo estar agradecido por haber nacido.

Puedo protestar por tener que trabajar o agradecer por tener un techo donde dormir.

Puedo lamentarme de las decepciones que he tenido con mis amigos o me puedo animar con la posibilidad de hacer nuevas amistades.

Si las cosas no son como las planifiqué, puedo sentirme feliz por tener hoy que empezar de nuevo.

El día está frente a mí esperando ser lo que yo quiera que sea.

Y aquí estoy yo, un escultor que le puede dar forma.

"Todo Depende de mí".

GLOSARIO DE TÉRMINOS

Abreviatura	Nombre
ADN	Ácido Desoxi-ribonucleico
AF-1	Función de Activación Transcripcional 1
AF-2	Función de Activación Transcripcional 2
ANG	Angiogenina
AP1	Factor Transcripcional
ARN	Ácido Ribonucleico
ARNm-ANG	ARN-mensajero que codifica para ANG
BRCA1, BRCA2 y BRCA3	Genes Supresores de Tumores
BE	Bromuro de Etidio
CaM	Cáncer de Mama
CONAPO	Consejo Nacional de Población de México
dNTP's	Desoxinucleótidos Trifosfato
EDTA	Ácido Etilén Diamino Tetraacético
EGF	Factor de Crecimiento Epidermal
ERE	Elemento de Respuesta a Estrógenos
E ₂	Estradiol
FGFb	Factor de Crecimiento Básico de Fibroblastos
FMF h	Formamida 50%, MOPS 1X y Formaldehído 7% Horas
HIF-1	Factor Inducible de Hipoxia
hsp90	Heat Shock Protein (del idioma inglés)
IL-6	Interleucina-6
kDa	Kilo Daltones
min	Minutos
MOPS	Ácido 3-[N-Morfolino] Propanosulfónico

NFkB	Factor Transcripcional
ng	Nano gramos
nm	Nano metros
pb	Pares de Bases
RAR-1	Receptor α 1 del Ácido Retinoico
RE	Receptor de Estrógenos
RE α	Receptor de Estrógenos Alfa
RE β	Receptor de Estrógenos Beta
RIPS	Receptor Interacting Proteins
RT-PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
SFB	Suero de Feto Bovino
SFB-C	Suero de Feto Bovino tratado con Carbón Dextrán
SP1	Factor Transcripcional
TGF β	Factor de Crecimiento Transformante tipo beta
TNF α	Factor de Necrosis Tumoral tipo alfa
TRH	Terapia de Reemplazo Hormonal
UV	Ultravioleta
VEGF	Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular
VPH	virus de papiloma humano
WHI	Women's Health Initiative (del idioma inglés)
Zn ²⁺	Zinc

INDICE

Glosario de Abreviaturas.....	11
Resumen.....	15
I. Introducción.....	17
I.1. Glándula mamaria.....	17
I.2. Cáncer de mama (CaM).....	20
I.2.1. Etiología del CaM.....	20
I.2.2. Epidemiología del CaM.....	21
I.2.3. Factores de riesgo del CaM.....	25
I.2.4. Progresión del CaM.....	27
I.3. Angiogénesis en el CaM.....	29
I.4. Papel de la ANG en el CaM.....	32
I.5. Papel de los estrógenos en la angiogénesis.....	35
I.6. Mecanismo de acción de los estrógenos en el CaM.....	36
II. Antecedentes.....	43
III. Justificación.....	46
IV. Hipótesis.....	47
V. Objetivos.....	47
V.1. Objetivo General.....	47
V.2. Objetivos Específicos.....	47
VI. Material y Métodos.....	48
VI.1 Cultivo de las líneas celulares.....	48
A. Líneas celulares.....	48
B. Medio de cultivo celular.....	48
C. Cultivo de las líneas celulares, MCF-7 y MDA-MB-231.....	49

VI.2. Análisis de la Expresión del ARNm.....	50
A. Aislamiento del ARN total.....	50
B. Electroforesis de ARN en geles de agarosa en condiciones desnaturalizantes.....	50
C. Amplificación del ANDc que codifica a la ANG.....	51
VI.3. Análisis estadístico.....	53
VII. Resultados y Discusión.....	54
VII.1. Expresión basal del ARNm de ANG en líneas celulares de CaM.....	54
VII.2. Efecto del E ₂ sobre la expresión del ARNm que codifica para ANG en líneas celulares de CaM.....	57
VII.3. Efecto del anti-estrógeno ICI sobre la expresión del ARNm que codifica para ANG en líneas celulares de CaM.....	60
VIII. Conclusiones.....	63
IX. Perspectivas.....	66
X. Referencias.....	67
X.1. Referencias de imágenes.....	74

RESUMEN

El cáncer es una de las causas principales de muerte en todo el mundo. En México, los tumores malignos se encuentran dentro de las principales causas de defunciones. En las mujeres, el 15.0% de las defunciones por tumores malignos corresponden al de glándula mamaria.

El cáncer de mama es causado por alteraciones en algunos genes que controlan el crecimiento, la diferenciación, la proliferación y la muerte de las células normales. Estas células cancerosas pueden invadir y destruir el tejido a su alrededor. Además, las células cancerosas pueden desprenderse de un tumor maligno (metástasis) y entrar al sistema linfático o al torrente sanguíneo, vía circulación sistémica.

El cáncer mamario, como otras neoplasias malignas, tiene un origen multifactorial. Existen evidencias que indican que las hormonas esteroides sexuales (estrógenos), juegan un papel determinante en la génesis del cáncer de mama. Los estrógenos regulan una gran variedad de eventos celulares, modificando la expresión de genes relacionados con la función vascular, así como puedan ser inductoras de la angiogénesis. Se ha demostrado la presencia de receptores de estrógenos en las células que constituyen el endotelio vascular. Sus efectos podrían estar mediados por la regulación de los genes que codifican al FGFb, la ANG y la endostatina. El E₂ induce la proliferación y la migración de células endoteliales mediada por el receptor de estrógenos.

La formación de nuevos vasos sanguíneos (neoangiogénesis), es requerida durante la progresión del tumor debido a que facilita el suplemento de nutrientes y es un requisito para que el tumor pueda desarrollar la metástasis y que la sobrevivencia del tumor y el establecimiento de lesiones metastásicas que dependen de cambios en el balance normal de algunos factores de crecimiento claves como el VEGF y la ANG en favor de la angiogénesis. Sin embargo, hay muchos otros factores que pueden

estar regulando el crecimiento tumoral, la angiogénesis y la metástasis que aún no han sido estudiados.

El objetivo de este trabajo de investigación fue el determinar el papel de los estrógenos en la regulación de la expresión de la ANG, utilizando como modelo experimental las líneas celulares de cáncer de mama MCF-7 (RE α y β positivos) y MDA-MB-231 (RE β positivo).

Ambas líneas celulares fueron cultivadas en medio DMEM sin rojo fenol, suplementado con 2.5% de suero bovino fetal tratado con carbón-dextrán (SBFC). Las células se incubaron con diferentes concentraciones 1, 100, 1000 pM de estradiol. Se determinó la expresión semi-cuantitativa del ARNm-ANG, por medio de la técnica de retrotranscripción seguida de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR).

Los resultados mostraron que el E₂, a concentraciones de 100-1000 pM e incubado por 24-48 h, es capaz de inhibir la expresión del ARNm-ANG en la línea celular MCF-7 ($p < 0.05$); mientras que en la línea celular MDA-MB-231, la concentración 1000 pM de E₂ incubado durante 48h, fue capaz de incrementar la expresión del ARNm-ANG ($p < 0.05$), lo cual sugiere que los mecanismos moleculares que regulan la expresión de ANG son múltiples, dependen de los tipos celulares y de la presencia de los diferentes tipos de RE. Por otro lado se realizaron experimentos utilizando el anti-estrógeno ICI 182,780, observándose que sólo en la línea celular MCF-7, se bloqueó el efecto inhibitorio del E₂ sobre la síntesis del ARNm-ANG, el cual podría ser a través del RE α . Mientras que en la línea celular MDA-MB-231, el ICI no modificó la expresión del ARNm-ANG.

I. INTRODUCCIÓN

I.1. Glándula mamaria

La función principal de la glándula mamaria humana es la de producir leche para permitir la nutrición durante los primeros meses del recién nacido. Está formada por los tejidos conectivo, adiposo y glandular, así como vasos sanguíneos y linfáticos. El desarrollo de la glándula mamaria se produce en tres etapas: durante el desarrollo embrionario, en la pubertad y durante el embarazo (Figura 1). La glándula mamaria, al igual que el eje hipotálamo-hipófisis-ovario, permanece quiescente hasta la pubertad, cuando se inicia el funcionamiento de este eje, el cual favorece el crecimiento y desarrollo de los folículos ováricos (foliculogénesis) incrementando la secreción de estrógenos y progesterona, lo cual desencadena el crecimiento, desarrollo y la maduración de la glándula mamaria. Durante la pubertad se produce el aumento de tamaño de la mama, la cual, en la mujer, recubre de la segunda a la sexta costillas. El tejido glandular está sumergido en grasa (Figura 2), que constituye la mayor parte de la masa de la mama (Beatrice *et al*, 2000; Ceriani, 1974; Hinck, *et al*, 2005; Yen *et al*, 2001).

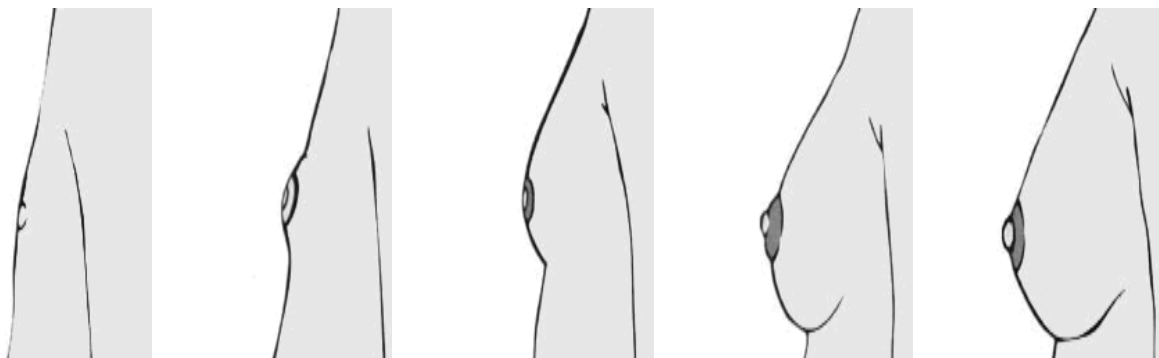


Figura 1. Esquema representativo del desarrollo de la glándula mamaria humana, comenzando en la niñez (izquierda), hasta que está totalmente diferenciada y funcional durante la lactancia (derecha) (Imagen tomada de <http://www.youngwomenshealth.org/Images/breasts5.gif>).

El desarrollo de la glándula mamaria depende principalmente de los estrógenos secretados por los ovarios durante la fase folicular del ciclo menstrual normal, presentando su posterior involución debido a la disminución en la concentración circulante de las hormonas ováricas durante la menstruación. Hay diferentes estudios que señalan que los estrógenos son los primeros inductores de la proliferación del epitelio celular de la glándula mamaria y pueden regular su proliferación durante el ciclo menstrual. En la mujer adulta, no embarazada ni lactante, la proliferación epitelial en la glándula mamaria se realiza principalmente durante la fase folicular del ciclo menstrual, cuando las concentraciones de estrógenos son elevadas y la progesterona esta disminuida (Clarke, 2003; Valdés *et al*, 1994; Yen *et al*, 2001).

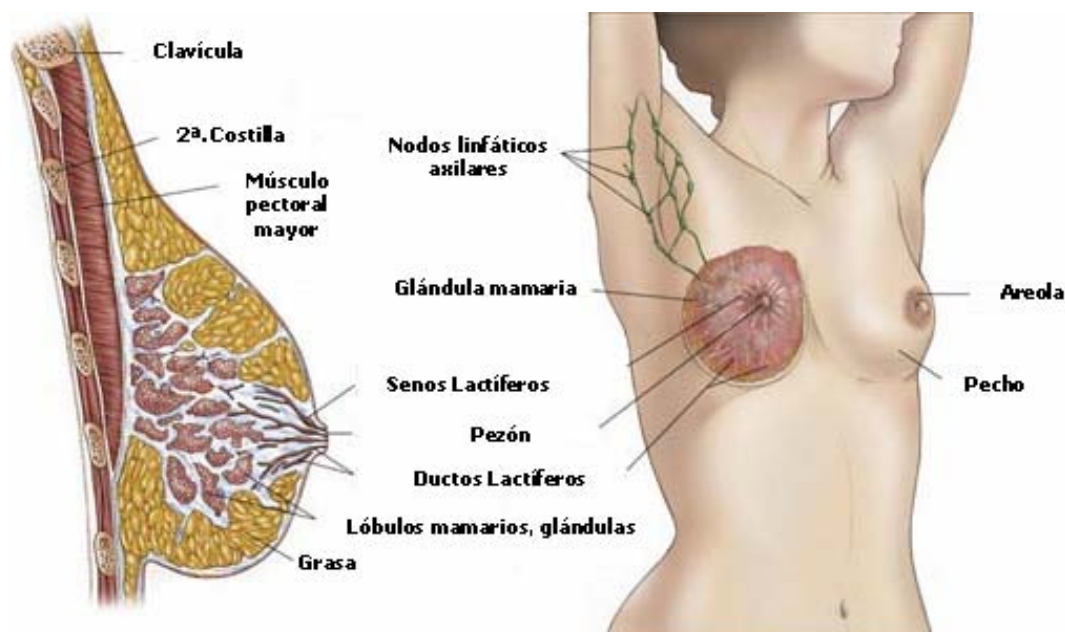


Figura 2. Glándula mamaria de una mujer madura, la cual recubre de la segunda a la sexta costillas, está compuesta de tejido adiposo y conectivo, también se encuentra formada por lóbulos lactíferos, ductos lactíferos, irrigaciones linfáticas y sanguíneas (Imagen tomada de http://www.valley-homecare.com/resource/images/breast_credit.jpg).

Cuando inicia el embarazo, se desarrolla una segunda ronda de proliferación debido a que la mama se prepara para la lactancia; en esta etapa la glándula es estimulada por un gran número de hormonas como los estrógenos, la progesterona, los andrógenos, la prolactina, la tiroxina, los glucocorticoides y la insulina, entre otros generando que las mamas aumenten notablemente su tamaño y un incremento en la irrigación sanguínea (Neville, 2001; Valdés *et al*, 1994; Yen *et al*, 2001).

Estos eventos confirman la idea de que la glándula mamaria es un órgano dinámico, que se remodela continuamente bajo la influencia de diferentes hormonas. El alto recambio de sus células, principalmente las que forman los ductos, son susceptibles a la carcinogénesis. Hay evidencias que sugieren que el alto riesgo de desarrollar cáncer en esta glándula está asociado principalmente a la exposición prolongada de los estrógenos, lo que aumenta significativamente el riesgo en mujeres que presentan menarquia en edad temprana (menores a los 12 años), menopausia tardía (mayor a 45 años) y en forma concomitante con la utilización de terapia de reemplazo hormonal y uso de anticonceptivos hormonales por períodos prolongados. Un posible mecanismo de que los estrógenos pueden contribuir al desarrollo del cáncer, radica en el hecho de que estos estimulan la proliferación de las células de la glándula mamaria, que al acelerar la velocidad de síntesis del ADN, aumenta el riesgo de replicar los errores por lo tanto lo hace más susceptible a generar células neoplásicas (Beatrice *et al*, 2000; Clarke, 2000; Deroo *et al* 2006; Russo *et al*, 1998; Suzuki *et al*, 2005).

Hay estudios *in vitro* e *in vivo* donde se ha comprobado que los estrógenos incrementan la proliferación de células cancerosas humanas y promueven el crecimiento de tumores mamarios en animales de laboratorio. Además, se ha correlacionado el desarrollo del cáncer de mama con altas concentraciones de estrógenos en sangre, lo que se refuerza por el hecho de que la mayoría de los tejidos obtenidos de mujeres con cáncer de mama expresan RE y por tanto, presentan una respuesta favorable, al menos al inicio, cuando son tratados con

terapias antiestrogénicas a través de sus receptores; si los tumores no expresan los RE (RE-negativo) suelen ser más agresivos y el pronóstico es desfavorable, debido a que a mayor diferenciación se pierde la expresión de los RE's, por lo que no responden a tratamientos convencionales (Acconcia *et al*, 2005; Cópola *et al*, 2005).

I.2. Cáncer de mama (CaM)

I.2.1. Etiología del CaM

El CaM, se origina en las células de los lóbulos y conductos mamarios. Las células normales se reproducen y mueren en forma equilibrada, pero pueden volverse malignas cuando se pierde la regulación, lo cual puede ser causado por alteraciones en algunos genes que controlan el crecimiento, la diferenciación, la proliferación y la muerte de las células normales. Cuando las células proliferan en forma excesiva, se produce una masa de tejido que se denomina tumor (Figura 3). No todos los tumores son cancerosos, ya que algunos de estos pueden ser benignos, los cuales se pueden remover quirúrgicamente y en la mayoría de los casos no reaparecen. El tumor original se denomina primario y casi siempre se nombra de acuerdo con la parte del cuerpo o el tipo de célula donde se inició. Las células de estos tumores son anormales y se dividen sin control (NCI-NIH, 2005).

Las células modificadas pueden invadir y destruir el tejido a su alrededor, lo que les permite desprenderse del tejido que las originó (metástasis), que al involucrar al sistema linfático o al torrente sanguíneo pueden invadir otros tejidos. Debido a que el sistema linfático lleva la linfa y los glóbulos blancos de la sangre a todos los tejidos del cuerpo, frecuentemente se pueden encontrar células cancerosas en los ganglios linfáticos regionales (masas redondeadas de tejido linfático) cercanos al tumor primario (NCI-NIH, 2005).

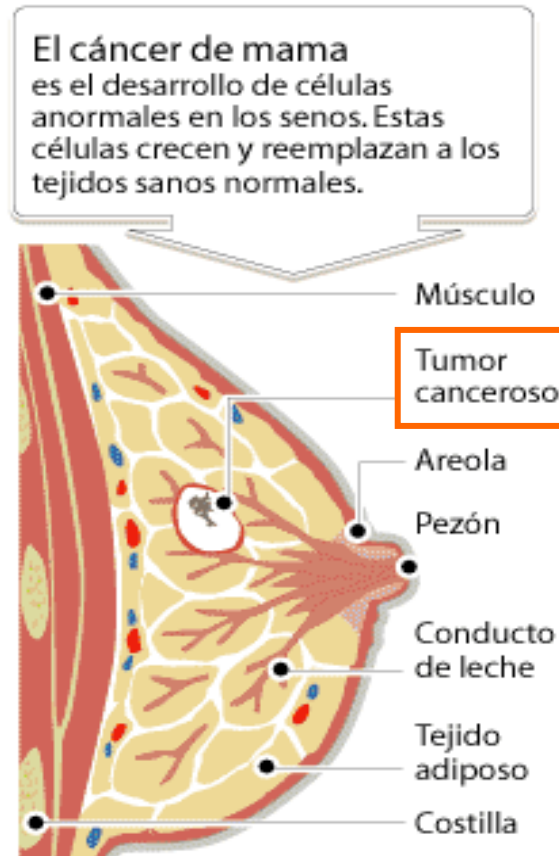


Figura 3. Imagen representativa de una glándula mamaria en la cual se puede observar la presencia de un tumor canceroso. (Imagen tomada de Darmuth-Hitchcok Medical Center, www.dhmc.org; http://www.emol.com/especiales/infografias/enfermedades_ginecologicas/cancer_demama.gif)

I.2.2. Epidemiología del CaM

El cáncer es una de las causas principales de muerte en todo el mundo, solamente excedida por las enfermedades cardiovasculares. En el año 2005 se produjeron un total de 58 millones de muertes en el mundo, de las cuales 7.6

millones de muertes fueron a causa del cáncer (es decir, el 13%) y 502,000 muertes fueron a causa del cáncer de mama. Se prevé que las muertes por cáncer continúen aumentando, con un estimado de 9 millones de muertes en el año 2015, ya que se detectan más de 10 millones de casos nuevos de cáncer por año (WHO, 2006).

Los países norteamericanos y europeos son los que tienen la frecuencia más elevada de cáncer de mama, mientras que los países de Asia y África tienen la más baja. Los países latinoamericanos, en general, también tienen una baja frecuencia y mortalidad, excepción hecha de Argentina y Uruguay que tienen tasas semejantes a la de los países europeos. Este hecho es quizá explicable por la conformación mayoritariamente europea del origen de su población, a diferencia del resto de los países latinoamericanos (FUCAM, 2005).

A diferencia de otros países, como Estados Unidos y Canadá, en México durante los últimos años, el porcentaje de mortalidad por cáncer mamario se ha incrementado de 13.1% en 1990 a 15% en el año 2006, por cada 100 000 mujeres de más de 25 años. A pesar de que la tasa de crecimiento de esta enfermedad puede considerarse baja en comparación con la que presentan otros países de Latinoamérica, el incremento real en el número de defunciones fue del 56.1% en el mismo período, pasando de 2,214 muertes asociadas directamente con el cáncer de mama en 1990 a 3,455 en el año 2000, lo cual se debe a la expansión de este grupo poblacional y también al hecho de que los programas de detección temprana y de investigación en este campo siguen siendo insuficientes. En el grupo de mujeres mayores a 25 años, el ritmo de crecimiento anual es superior al 5%; según proyecciones del CONAPO, en el año 2000 había 23.9 millones de mujeres en este grupo de edad y se estima que para el año 2020 alcanzará los 38.8 millones (INEGI, 2008).

En México, las enfermedades del corazón, la diabetes y los tumores malignos son las tres causas con mayores porcentajes de defunción. En el año 2006 se registraron en México 494 471 defunciones, donde los tumores malignos ocuparon el

tercer lugar en la lista de principales causas de defunción en el país, por dicha causa fallecieron 63 888 personas. Las defunciones por tumores malignos representaron el 11.3% del total de fallecimientos en los varones y 14.5%, en las mujeres (Figura 4), de las cuales el 15.0% corresponden al de CaM y 13.9% al del cuello del útero (cervico-uterino), en la figura 5 se muestra la distribución porcentual, según el tipo de tumor maligno (INEGI, 2008).

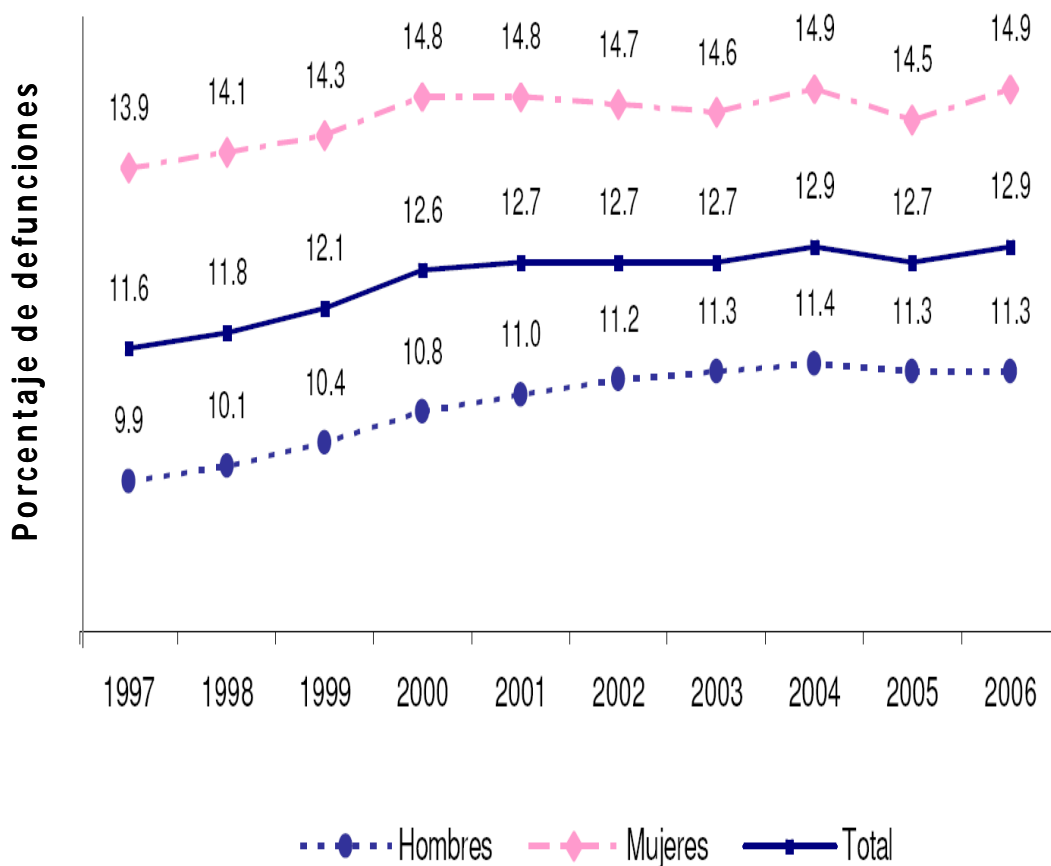


Figura 4. Porcentajes de defunciones generales y por sexo causadas por tumores malignos, del período de 1997 hasta el 2006. El porcentaje esta en relación con el total de defunciones registradas en cada año, en general y por sexo (INEGI, 2008).

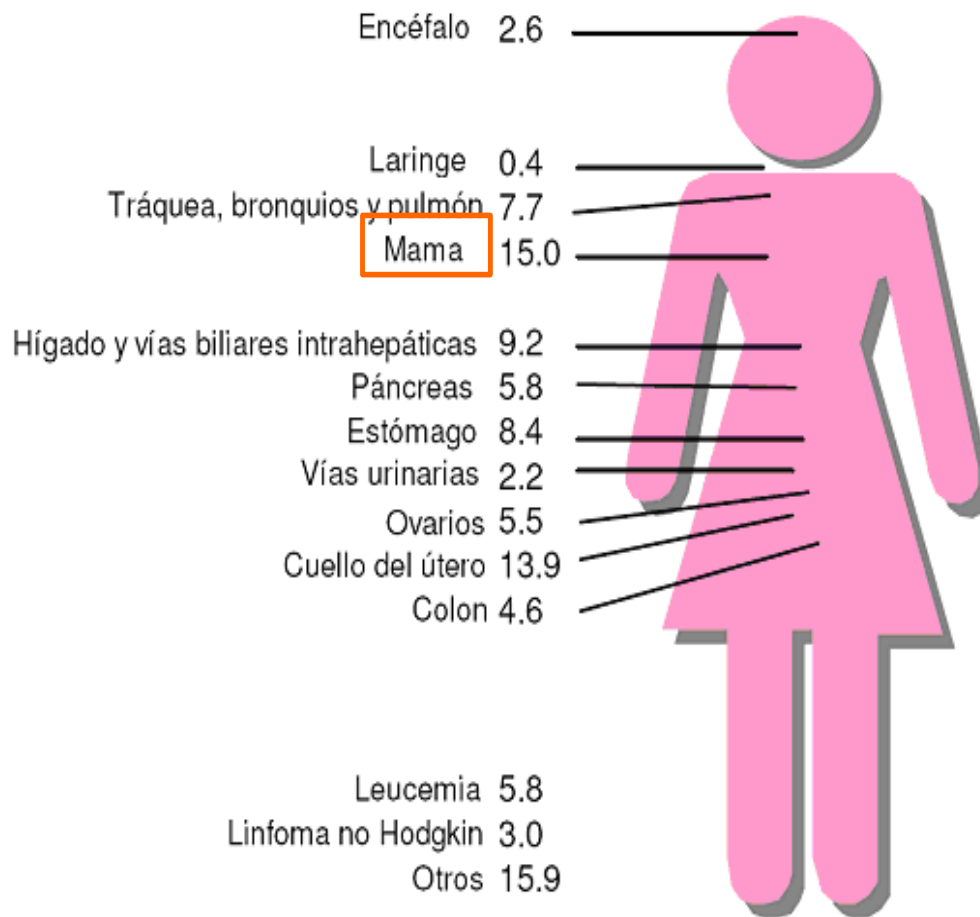


Figura 5. Distribución porcentual de los principales tumores malignos, siendo el cáncer de mama, la primera causa de muerte (INEGI, 2008.).

En México, durante el año 2006, el 47% de las defunciones femeninas por CaM correspondieron a mujeres entre los 45 y 64 años de edad, de las cuales un alto porcentaje (45.5%) se diagnosticó en etapas avanzadas y en mujeres menores a 50 con probabilidades de recuperación de sólo el 35%. Estos datos contrastan con los obtenidos en países desarrollados, como Estados Unidos de Norteamérica, donde el 80% de los casos de cáncer de mama se diagnostican en etapas tempranas y por tanto, las probabilidades de presentar sobrevida mayor a 10 años es superior al 80% (FUCAM, 2005; NCI-NIH, 2005).

Por su frecuencia cada vez mayor, el cáncer de mama es actualmente uno de los principales problemas de salud de la mujer mexicana. El creciente aumento de la enfermedad se encuentra relacionado con numerosos factores como la falta de información oportuna, carencia de recursos para realizar mastografías en zonas rurales. El grado de riesgo no es homogéneo entre la población en general; es así como encontramos que mientras algunas mujeres nunca desarrollarán el cáncer de mama otras parecen tener un mayor riesgo de padecerlo (FUCAM, 2005).

I.2.3. Factores de riesgo del CaM

El CaM se encuentra relacionado en primer lugar, con la fisiología de la mujer, ya que éste se presenta en hombres en menos del 1% del total de casos. Otros factores de riesgo (Tabla 1) se asocian con la edad, con la etnia, el nivel socioeconómico y, principalmente, con factores relacionados con estilos de vida contemporáneos, algunos asociados directamente a la vida reproductiva de la mujer, los cuales se han demostrado que tienen un papel determinante en el origen y progresión de esta enfermedad. Entre estos también se incluyen la menarquia temprana, menopausia tardía, nuliparidad y edad al nacimiento del primer hijo e incluso la ausencia de lactancia (Clarke, 2000; FUCAM, 2005; Kelsey *et al*, 1993; Kuale *et al*, 1987; NCI-NIH, 2005; Medina, 2005).

A estos factores se suman otros, como el consumo de estrógenos en formulaciones anticonceptivas y de TRH durante el climaterio y la condición postmenopáusica, además del consumo de estrógenos ambientales como los fitoestrógenos y los xenoestrógenos presentes en algunos alimentos. El mayor riesgo de cáncer de mama asociado con el uso de estrógenos exógenos en la TRH se estableció en los estudios realizados por la organización "Iniciativa para la Salud de la Mujer (WHI) y por los "Colaboradores en el estudio de millones de mujeres" (Million

Women Study Collaborators) donde se sugiere que su uso durante o más de 10 años se asocia con un aumento significativo en el riesgo cáncer de mama. Muchos investigadores sugieren que los estrógenos son uno de los principales reguladores de la tumorigénesis en la glándula mamaria (Cóppola *et al*, 2005; Elkin *et al*, 2003; López *et al*, 1997; Safe, 1995; Yen *et al*, 2001).

Tabla 1. Factores de riesgo del cáncer de mama en México (FUCAM, 2005).

FACTORES	RIESGO ALTO	RIESGO BAJO
Edad	Mayores de 40	Menores de 40
Regiones geográficas	Norteamérica y Europa Occidental	Asia, África y América Latina
Nivel Socioeconómico	Alto	Bajo
Residencia	Urbano	Rural
Edad 1er embarazo	Mayor a 30 años	Menor a 20 años
Ooforectomía	No	Sí
Constitución corporal post-menopáusica	Obesa	Delgada
Edad de la Menarquia	Precoz (< 12años)	Tardía
Edad de Menopausia	Tardía (> 54 años)	Precoz
Historia de cáncer de mama familiar	Sí	No
Antecedente personal de cáncer de ovario o endometrio	Sí	No
Radiación al tórax	Sí	No

Los factores que se asocian al desarrollo del CaM se pueden dividir en dos grupos: los que producen daño al ADN, los cuales se denominan genotóxicos; y los que estimulan la proliferación, desarrollo y crecimiento tumoral, son nombrados de tipo mitogénicos (Suzuki *et al*, 2005).

Muchos cambios genéticos que conducen al cáncer son resultado de la interacción entre factores genéticos y agentes externos, que se pueden clasificar en:

- ✓ Carcinógenos Físicos, como la exposición a los rayos UV y a la radiación ionizante,
- ✓ Carcinógenos Químicos, como el uso del tabaco,
- ✓ Carcinógenos Biológicos, como las infecciones por virus (el VPH -Cáncer Cérvico uterino-) y bacterias (*Helicobacter pylori* -cáncer gástrico-).

Si bien el cáncer mamario tiene un origen multifactorial, existe evidencia de que las mutaciones de genes específicos incrementan la susceptibilidad para su desarrollo. Entre ellos se encuentran diversos oncogenes, como, *c-myc*, *v-ras*, *K-ras*, *v-raf*, *src*, *fos* factores de crecimiento y genes supresores de tumores como BRCA1, BRCA2 y BRCA3 que son activados, bloqueados o expresados inadecuadamente en el cáncer mamario; sin embargo, el presentar mutaciones en estos genes no significa necesariamente que la persona vaya a desarrollar CaM, sino que sus posibilidades de presentar cáncer son mayores (Bos, 1989; Gusterson *et al*, 1988; Hall *et al*, 1990; NCI-NIH, 2005; Rajkulmar y Gullick, 1994; StüpieÄ *et al*, 2002; WHO, 2006).

I.2.4. Progresión del CaM

El cáncer de mama puede originarse cuando una célula se transforma (neoplasia) al presentar anomalías genéticas o epigenéticas, iniciándose un proceso de proliferación descontrolada de las células, dando origen al estado de hiperplasia; cuando éstas proliferan en forma desmedida se genera un tumor (displasia) que puede convertirse en cáncer (Figura 6). Las células de cáncer de mama, al principio, pueden proliferar lentamente, sin invadir ni infiltrarse a tejidos adyacentes, llegando a formar un tumor prominente que desplaza estructuras vecinas, alcanzando un gran tamaño, pero sin desplazarse del lugar de origen

(cáncer *in situ*). Este tipo de cáncer con frecuencia se convierte en infiltrante cuando se rompe la membrana basal y se vuelve invasivo (metástasis). El hecho de detectar un tumor en estadios tempranos (antes de ser infiltrante) es importante debido a que su diagnóstico precoz garantiza un mayor tiempo de supervivencia (período entre la detección de la enfermedad y el fallecimiento por esta causa). Cuando un cáncer de mama ha comenzado a invadir los tejidos vecinos, inicia su diseminación (Paweletz *et al*, 2001).

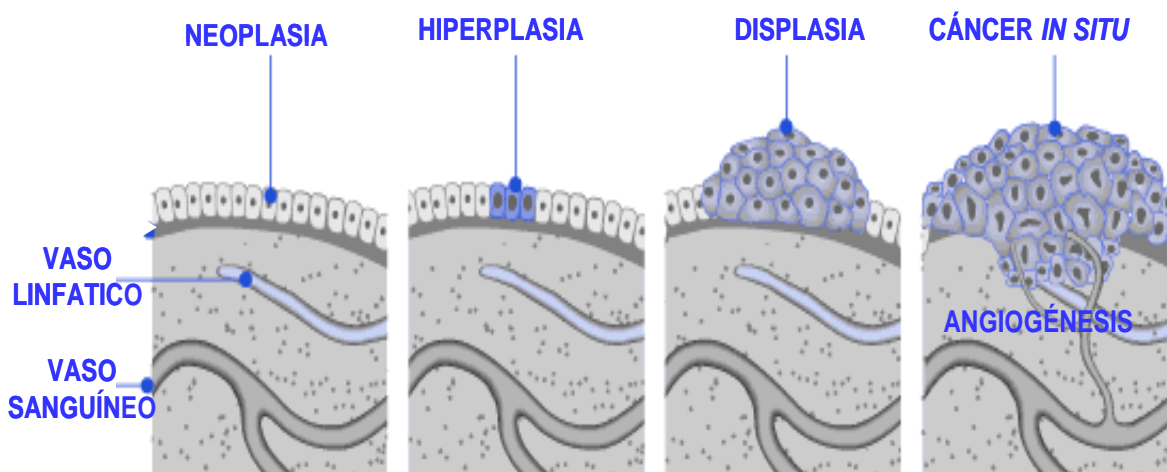


Figura 6. Representación esquemática de la progresión del cáncer, en la cual se indican algunas de las diferentes etapas del cáncer como son, neoplasia (modificaciones en la expresión génica); hiperplasia (aumento de tamaño y número de células); displasia, (formación de un tumor); cáncer *in situ* y metástasis debido a la formación de nuevos vasos sanguíneos (Imagen tomada de http://www.cancervic.org.au/about-cancer/what_is_cancer.gif).

El siguiente paso del tumor es la invasión hacia los ganglios, donde en la mayoría de los casos se afectan ganglios axilares, siendo la primera estación de paso linfática hacia otros órganos. En la mayoría de los casos, este ganglio está situado en la región axilar del mismo lado que la glándula mamaria afectada; sin embargo, a veces un tumor mamario elige un camino poco usual, extendiéndose a la cadena de

ganglios del lado de la vena mamaria interna, que se sitúa a los largo del borde del esternón; independientemente de cual sea el tipo de evolución local, la progresión por la vía del sistema sanguíneo o linfático, puede dar origen al desprendimiento de células metastásicas, las cuales pueden ser solitarias y migrar a sitios cercanos a la lesión (ganglios axilares) o producirse múltiples metástasis (Figura 7), donde los principales tejidos a donde viajan son hígado, pulmones, huesos y cerebro (Paweletz *et al*, 2001).

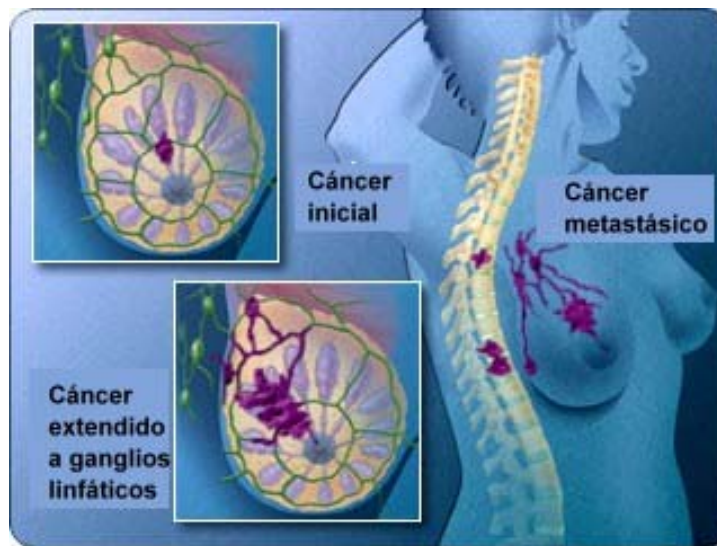


Figura 7. Representación esquemática de las células cancerosas invadiendo tejidos vecinos, las cuales pueden viajar a través de vasos sanguíneos a otras partes del cuerpo (metástasis) (Imagen tomada de <http://www.cepvi.com/medicina/articulos/cancer.shtml>).

I.3. Angiogénesis en el CaM

El crecimiento de tumores sólidos depende de la formación de nuevos capilares, proceso conocido como angiogénesis. La angiogénesis es un importante mediador de la progresión del tumor, debido a que los vasos sanguíneos transportan suplementos como los nutrientes y oxígeno esenciales para el crecimiento del tumor.

Además, los vasos sanguíneos transportan los desechos metabólicos del tumor y también proporcionan guías vasculares para la salida de células transformadas a los sitios alejados (Fox, 1997; Rayson *et al*, 1999; Smith *et al*, 1999).

La progresión del tumor se caracteriza por el crecimiento descontrolado de las células. Inicialmente, el crecimiento de pequeños agrupamientos de células malignas está limitado por la falta de nutrientes y oxígeno. Con respecto a la angiogénesis, la progresión del tumor puede ser dividida en 2 fases: una prevascular y otra vascular (Rayson *et al*, 1999).

La fase prevascular se caracteriza por el crecimiento inicial del tumor, seguido por una meseta en el crecimiento y el tamaño del tumor, esta puede persistir por meses e incluso años y se caracteriza por no presentar metástasis. Los nuevos vasos sanguíneos en el tumor primario pueden servir como una ruta por la cual las células tumorales puedan salir del sitio primario y entrar al flujo sanguíneo, pasando a la fase vascular, la cual consiste en un período de crecimiento rápido e invasión local. Con el incremento de la angiogénesis, aumenta la probabilidad de que las células tumorales entren en la circulación sanguínea y se diseminen (Rayson *et al*, 1999).

La angiogénesis es controlada por factores denominados angiogénicos, los cuales pueden ser liberados por las células tumorales. La formación de nuevos vasos sanguíneos (neoangiogénesis), a partir de una red vascular existente, es un proceso complejo, pero esencial para la oncogénesis. El fenotipo angiogénico es característico del cáncer *in situ* y puede ser usado como marcador de pronóstico, como se ha demostrado para los tumores de mama invasivos con alta densidad vascular (Fox, 1997; Vogl *et al*, 2005).

Se ha establecido que la neoangiogénesis que se presenta comúnmente en condiciones no patológicas, constituye la base de la organogénesis de muchos tejidos, incluyendo la regeneración del endometrio uterino después de cada sangrado menstrual y está regulada a través de múltiples y complejos mecanismos (Figura 8) que involucran la acción de diferentes factores de crecimiento como: EGF, TGF β ,

TNF α , VEGF y la ANG. Con excepción de la ANG, la cual ha sido poco estudiada, todas estas proteínas angiogénicas modulan directamente el crecimiento de las células endoteliales y la degradación de la matriz extracelular, lo que permite que las células endoteliales puedan migrar, proliferar y diferenciarse (Szyf *et al*, 2004; Montero *et al*, 1998; Soncin *et al*, 1992).

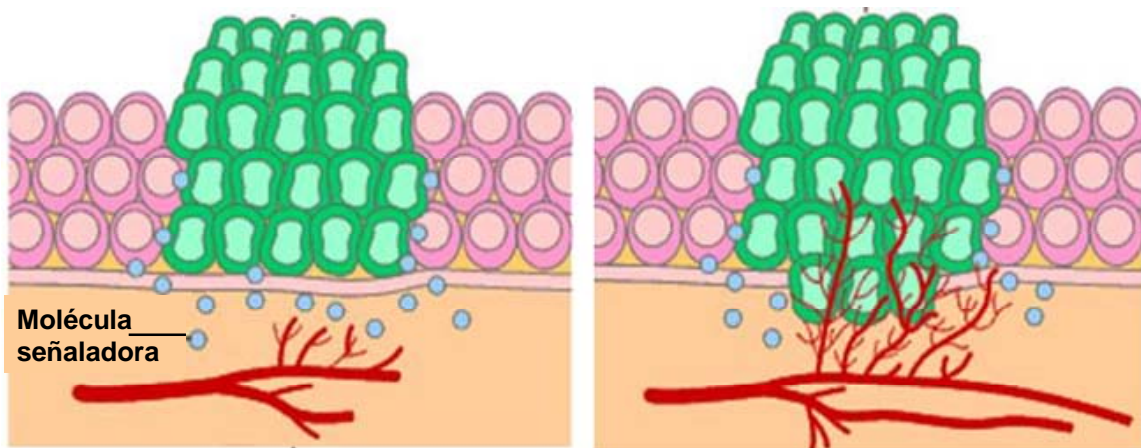


Figura 8. Representación esquemática del proceso de angiogénesis inducido por factores angiogénicos (Imagen tomada de http://www.seom.org/seomcms/images/stories/imagenes/socios_yprofs/documentación/baseoncologia/2006/foto03.gif).

La angiogénesis es indispensable para que el tumor pueda desarrollar la metástasis y sobrevivir. Aunado al hecho de que el establecimiento de las lesiones metastásicas dependen de cambios en el balance normal de factores proangiogénicos como TGF β , EGF, TNF α , VEGF y ANG y antiangiogénicos como trombospondina 1, angiostatina o endostatina (Dabrosin, 2005; Ellis, 2004; Jadeski *et al*, 2000; Harlozinska *et al*, 2005; StüpieÄ *et al*, 2002).

I.4. Papel de la ANG en el CaM

Uno de los estimuladores más potentes de la formación de vasos sanguíneos es la ANG. En la glándula mamaria normal, se observó que la ANG está presente en células epiteliales de los ductos. La presencia de ANG en el epitelio de mama normal y neoplásica, indican que la ANG es sintetizada por las células de mama. Se han realizado estudios en los que se ha demostrado que la inhibición de la ANG puede bloquear la angiogénesis *in vitro* y prevenir el crecimiento de tumores *in vivo* (Montero *et al*, 1999; Vallee *et al*, 1997).

La ANG es una proteína de 14 kDa, llamada así por su capacidad para inducir la formación de vasos sanguíneos (Figura 9). Originalmente fue aislada como un factor angiogénico de la línea celular HT-29, que es un adenocarcinoma de colon humano. Este fue el primer tumor *in vivo* donde se observó la presencia de dicha proteína, también es expresada por otras líneas celulares tumorales, así como por células normales (Hu *et al*, 1991; Russo *et al*, 1996).

Así mismo, se ha aislado del plasma humano de sujetos sanos y puede inducir la neovascularización en la membrana corioalantoica de pollo, así como en la córnea del conejo. Hay reportes que señalan que los individuos a los cuales se les ha detectado concentraciones altas de ANG en plasma, tienen mayor riesgo en el desarrollo de diferentes tipos de carcinomas, especialmente el de vejiga (St Clair *et al*, 1987; Zhao *et al*, 2005).

La ANG posee actividades tanto angiogénicas como no angiogénicas, con respecto a esto, se ha observado que la secuencia de aminoácidos de la molécula posee alta homología con la ribonucleasa pancreática y está clasificada dentro de la familia de las ribonucleasas, RIBASE (ribonucleasas con especial actividad biológica), las cuales se caracterizan por presentar baja actividad degradativa del ARN ribosomal (D'Alessio, 1993; St. Clair *et al*, 1988; Shapiro, *et al*, 1986).



Figura 9. Representación de la ANG generado por el programa de computación MOLSCRIPT (Papageorgiou *et al*, 1997).

La ANG es codificada en la región subcentromérica del cromosoma 14. La proteína madura de ANG es una sola cadena de 123 aminoácidos. La ANG de conejo, bovino, puerco y ratón, poseen homología del 73%, 65%, 66% y 75%, respectivamente, con respecto a la ANG humana. Las células que expresan ANG incluyen el endotelio vascular, las células de músculo liso, fibroblastos, epitelio de colon normal, linfocitos periféricos de sangre normal, pulmón, líneas celulares tumorales de epitelio colónico y en adenocarcinomas primarios gastrointestinales. La ANG también ha sido expresada como una proteína recombinante en sistemas procarióticos y eucarióticos (Bond *et al*, 1993; Maes *et al*, 1988).

Se ha demostrado la presencia de un receptor específico en células endoteliales para ANG. El receptor es una proteína de 170 kDa que se expresa sólo cuando las células crecen a confluencias muy bajas (<50%). La presencia de este receptor se ha asociado a la actividad proliferativa que tiene sobre el endotelio. Aunque no se conocen a fondo las vías de transducción específicas de cómo llega el mensaje al núcleo celular, se sabe que la activación de este receptor promueve la

translocación nuclear de ANG, evento asociado e indispensable para su acción proangiogénica. Además, existe evidencia que en sistemas celulares no endoteliales que responden a ANG como células de músculo liso, el enlace de ANG a la superficie celular es mediado por actina (Hu *et al*, 1997; Wiedlocha, 1999). Se han observado sitios de unión a la membrana celular y pericelular los cuales son consistentes con la existencia de receptores y con los reportes tempranos de eventos intracelulares inducidos por hormonas (Moenner *et al*, 1994).

Se ha demostrado que la ANG induce eventos individuales en el proceso de angiogénesis, dentro de los cuales podemos encontrar: la estimulación de segundos mensajeros, la adhesión celular, la activación de células asociadas a proteasas, la inducción de la invasión celular, la organización de la formación de estructuras tubulares de células endoteliales en cultivos, entre otros (Hu *et al*, 1997).

La ANG posee otras actividades no angiogénicas, como la inhibición de la degranulación de neutrófilos y la estimulación de la esterificación del colesterol por las células de músculo liso, lo cual posiblemente contribuya a los estados tempranos de la arteroesclerosis (Moore, *et al*, 1990; Tschesche *et al*, 1994).

También posee otras propiedades biológicas, incluyendo citotóxicas, anti-helmínticas y antibacterianas. La función de la ANG esta dirigida a la alteración de la síntesis de proteínas, la cual actúa sobre la elongación o terminación de la cadena de péptidos, la división ocurre en la subunidad 18S de la unidad ribosomal 40S. La ANG también ha sido reportada por poseer actividad cidal contra infecciones sistémicas bacterianas y fúngicas (Campo *et al*, 2005).

Estudios clínicos han revelado que el incremento en la expresión de ANG está asociado con la progresión de varios cánceres humanos. Estas investigaciones identifican a la ANG como un factor blanco para nuevas drogas antineoplásicas. Los anticuerpos monoclonales y oligonucleótidos antisentido dirigidos contra ANG son efectivos en inhibir el establecimiento de sarcoma de colón, próstata, seno, pulmón y tumores en ratones atímicos. Recientemente se demostró que la inhibición en la

vascularización del tumor puede ser usado para diferentes tratamientos, así como en la predicción de la respuesta a la quimioterapia e identificación de la fase de transición del tumor benigno (pre-maligno) a maligno (Fox *et al*, 1995; Kao *et al*, 2002; Leonidas *et al*, 2001).

I.5. Papel de los estrógenos en la angiogénesis.

La vascularización es una función clave para proveer de nutrientes a las células. Se ha reconocido en mujeres que los cambios vasculares que ocurren en el tracto reproductivo están bajo el control de hormonas, desde entonces, la mayoría de las investigaciones han sido concentradas para entender el papel de estos esteroides en la regulación de factores angiogénicos y anti-angiogénicos en tejido normal y células neoplásicas de glándula mamaria. Además se ha reconocido que la expansión del tumor, depende del proceso de angiogénesis, así como la mayoría de las mujeres que padecen cáncer de mama, dependen de los esteroides sexuales (Carmeliet, 2005; Dabrosin 2005).

Los estrógenos regulan una gran variedad de eventos celulares, modificando la expresión de genes relacionados con la función vascular. Existen evidencias, de que estas hormonas puedan ser inductoras de la angiogénesis. Se ha demostrado la presencia de RE's en las células que constituyen el endotelio vascular. Sus efectos podrían estar mediados por la regulación de los genes que codifican al FGFB, la ANG y la endostatina (Homer *et al*, 2002; Hyder *et al*, 2000; Losordo *et al*, 2001; Mendelsohn *et al*, 1999; Soares *et al*, 2004).

El E₂ induce la proliferación y migración de células endoteliales mediada por el RE, el cual es expresado por estas células. Se ha observado que hay una relación entre la ANG y el RE, es decir, los carcinomas positivos a RE están asociados con los niveles elevados de ANG (Campo *et al*, 2005; Losordo *et al*, 2001; Montero *et al*, 1998).

I.6. Mecanismo de acción de los estrógenos en el CaM.

En la mayoría de los tejidos de carcinoma de mama se expresan los RE's, en donde los estrógenos influyen en su crecimiento (Clarke 2000; Suzuki *et al*, 2005). Existen evidencias que sugieren que la señalización del E₂ es requerida para la transformación de células normales al fenotipo maligno, mediante la activación de oncogenes (e.g. *c-fos*, *c-myc*) y otras proteínas nucleares (Acconcia *et al*, 2005; Szyf *et al*, 2004).

Después de un periodo de varios años, el tumor se vuelve hormono-independiente por un mecanismo por el cual aún no se ha dilucidado. Una explicación para la progresión del cáncer de mama es que las células cancerosas podrían involucrar la aparición de mutaciones y deleciones en el gen del RE que lo vuelve no funcional y a pesar de la unión del estrógeno, la célula falla a la respuesta hormonal. Un RE no funcional, puede explicar porque aproximadamente el 35-40% de pacientes con tumores con RE-positivo no responden a la terapia hormonal. En el siguiente esquema (Figura 10) se describe la progresión de las células normales hacia el carcinoma hormono-independiente. Existen evidencias que sugiere que la adquisición de tumores de mama independientes de estrógenos son acompañados por un incremento en la expresión de un conjunto de genes que son sobre-expresados por estrógenos durante la progresión del CaM dependiente de estrógenos (Guo *et al*, 2003; Pasqualini, 2004).

La relación del CaM con el E₂ es controversial. Se han realizado estudios en los cuales se ha mencionado, que los estrógenos, aunados a la predisposición genética, constituyen los elementos de mayor peso en la génesis de este cáncer (Kirscher, 1979; Medina, 2005; Pike *et al*, 1991).

Un considerable número de tumores de mama son dependientes de estrógenos, hay estudios que muestran que los estrógenos promueven la progresión

del CaM por interacción con receptores nucleares, los cuales regulan un importante conjunto de genes para el crecimiento del cáncer (Guo *et al*, 2003).

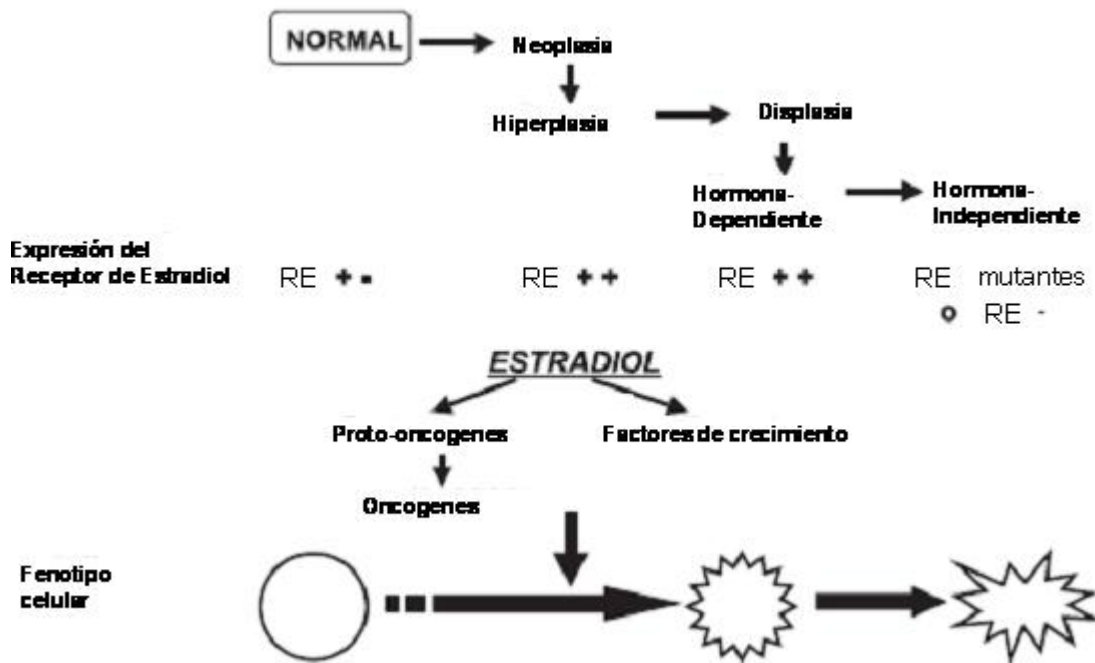


Figura 10. Transformación de las células de mama normales a carcinogénicas. En la cual se describe la progresión de las células normales de glándula mamaria hacia un carcinoma hormono-independiente. También se observa RE+: receptor de estrógenos positivo (detectable y funcional); RE mutantes: el receptor de estrógenos es detectable pero no funcional; RE- : el receptor de estrógenos negativo (no detectable) (Imagen tomada de Pasqualini, 2004).

Como se ha mencionado la mama es sensible a los estrógenos, los cuales pueden interactuar con otras hormonas como progesterona, testosterona, también interactúan con factores de crecimiento y citocinas en la regulación de la proliferación y diferenciación de la glándula mamaria (Clarke, 2000; Doisneau-Sixou *et al*, 2003; Sternlicht, 2005; Yen *et al*, 2001).

Hasta hace algunos años atrás se conocía un solo tipo de RE, ahora se sabe que el RE posee dos isoformas producto de dos genes distintos, estas isoformas son

denominadas RE α y RE β . El primer RE fue identificado en 1967, ahora se denomina RE α y su vida media es corta, se pensaba que éste era capaz de mediar todas las funciones inducidas por los estrógenos, incluyendo el control de la expresión de ciertos genes. En 1996, se identificó un segundo RE denominado RE β , el cual comparte gran homología en el dominio de unión al ADN con el RE identificado por primera vez. También se demostró la presencia de receptores de estrógenos en la membrana celular capaces de mediar los efectos rápidos, "no-genómicos" del E₂. El gen del RE α se localiza en el cromosoma 6q25.1, codifica para una proteína de 65kDa, formada por 595 aminoácidos, se expresa principalmente en glándula mamaria, útero, hipotálamo, hipófisis y ovario (Barrón *et al*, 2001; Márquez, 2001).

El gen del RE β se localiza en el cromosoma 14q22-24, codifica para dos isoformas de 55kDa (485 aminoácidos) y otra de 60kDa (530 aminoácidos), las cuales se expresan principalmente en riñón, timo, pulmón, bazo, hipotálamo, hipófisis, próstata, testículo, ovario, sistema digestivo, vejiga y glándula mamaria. Las formas del RE α y del RE β pueden coexistir en el mismo tejido, en las mismas células y pueden formar heterodímeros funcionales entre ellos. Ambos receptores poseen funciones diferentes de acuerdo al tejido donde ejercen su acción. Las formas RE α y RE β presentan en total 45% de homología y contienen la misma regionalización funcional, presentan el 96% de homología en el dominio de unión al ADN, pero solamente 56% en el dominio de unión a la hormona lo que hace que su afinidad por el E₂ sea diferente, siendo el RE α el más afín (Barrón *et al*, 2001; Márquez, 2001).

Los RE α y RE β están organizados en 6 dominios denominados por letras de la "A" a la "F" (Figura 11). La región A/B en el dominio amino Terminal (NH₂), es la región menos conservada, la cual activa la transcripción de genes regulados por estrógenos a través de la función de activación transcripcional (AF-1) además posee varios sitios de fosforilación, los cuales son importantes en el proceso de activación de la proteína. La región de unión al ADN o dominio C, es la más conservada,

compuesta de 9 residuos de cisteínas, de los cuales ocho están coordinados alrededor de dos iones de Zn^{2+} para formar dos dedos de Zn^{2+} , los cuales le permiten al receptor interactuar directamente con el ERE en el ADN. Después se presenta la región D o dominio de bisagra, la cual no ha sido bien caracterizada y participa en la unión a la proteína chaperona de choque térmico con peso molecular de 90kDa hsp90 (del idioma inglés "heat shock protein"), la cual permanece unida al receptor mientras éste se encuentre en un estado inactivo. Finalmente, el dominio de unión al ligando E/F, la región E es un dominio largo e hidrofóbico, el cual se pliega para formar una especie de bolsa hidrofóbica, en la cual se va unir el ligando; otras funciones de este dominio incluyen una segunda función de activación transcripcional (AF-2), la cual puede interaccionar con un co-activadores en conjunto con AF-1 o en forma independiente; mientras que en el dominio F, localizamos el carboxilo terminal (Barron *et al*, 2001; Gordler *et al*, 2000; Márquez, 2001; Nilsson *et al*, 2001).

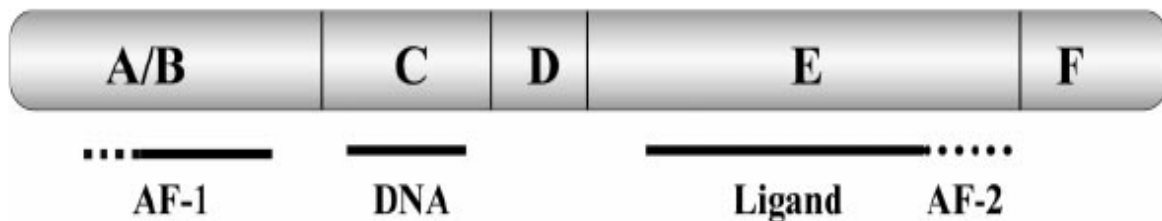


Figura 11. Representación en diagrama de los dominios estructurales de los receptores nucleares. El dominio A/B en el amino-terminal contiene un sitio AF-1 donde otros factores de transcripción interactúan. El dominio C/D contiene 2 dedos de zinc, estructuras que le permiten a la proteína unirse al ADN, y el dominio C/F contiene un sitio de activación de la transcripción denominado AF-2, el cual interactúa con coactivadores (Nilsson, et al, 2001).

La unión del ligando a los RE's desencadena cambios conformacionales en el receptor que conducen a varios eventos, principalmente modulan la velocidad de la transcripción de genes regulados por estrógenos. Estos eventos aun no han completamente entendidos, pero incluyen la dimerización del RE (Figura 11), la interacción del RE con el ADN, el reclutamiento e interacción con coactivadores y factores de transcripción, así como la formación de un complejo de preiniciación (Barron *et al*, 2001; Gordler *et al*, 2000; Márquez, 2001; Nilsson, *et al*, 2001).

La teoría clásica de acción de las hormonas esteroideas establece que el RE es activado al unirse a su ligando, en este caso el E₂ y actúa como un factor transcripcional al unirse al ADN, estimulando la transcripción de ciertos genes, este modo de acción de los esteroideas ha sido denominado "genómico", debido a que requiere la activación del receptor al unir su hormona específica después de haber atravesado la membrana, la homo o heterodimerización del complejo hormono-receptor y el reconocimiento de una secuencia específica en el ADN. En consecuencia el proceso de transcripción es activado al formarse el complejo de iniciación de la transcripción que incluye diferentes co-activadores, co-represores y proteínas reguladoras de la transcripción (Bonnie y Kenneth 2006; Márquez, 2001).

Un grupo de factores transcripcionales interactúa con el complejo hormono-receptor para formar un complejo de preiniciación al cual se le van a unir una serie de proteínas co-reguladoras llamadas, proteínas de interacción con receptores o RIPS; los cuales pueden activar o reprimir la transcripción. Este proceso, requiere de por lo menos 1-2 horas. En contraste, el complejo hormono-receptor se une a un elemento de respuesta indirectamente a través de interacciones proteína-proteína con sitios activadores AP1 o SP1 en la región promotora de genes de respuesta a estrógenos, resultando en un reclutamiento de proteínas co-reguladoras (co-activadores o co-represores) que interactúan con el promotor, este mecanismo ocurre rápidamente en cuestión de segundos o minutos y se denomina como mecanismo no genómico (Bonnie y Kenneth 2006; Márquez, 2001).

Ahora sabemos que el RE α y RE β también pueden modular la expresión de genes sin unirse directamente al ADN (Figura 12). Un ejemplo de acción indirecta sobre el ADN es la interacción física del RE α con el factor de transcripción Sp1. El RE α y RE β pueden activar la transcripción del gen del RAR1, presumiblemente por la formación de un complejo RE-Sp1 sobre sitios ricos en GC en el promotor de RAR1. Ambos RE α y RE β pueden interactuar con el factor transcripcional fos/jun formando un complejo el cual se une a sitios de AP1 para estimular la expresión de genes. Otro ejemplo es la interacción entre el RE α y el complejo NF κ B; esta interacción impide la unión de NF κ B y estimula la expresión de la IL-6. En esta vía, el E₂ inhibe la expresión de la IL-6. Estas interacciones previenen la unión de NF κ B y estimulan la expresión del promotor de IL-6 en esta vía, el E₂ inhibe la expresión de la IL-6 (Nilsson *et al*, 2001).

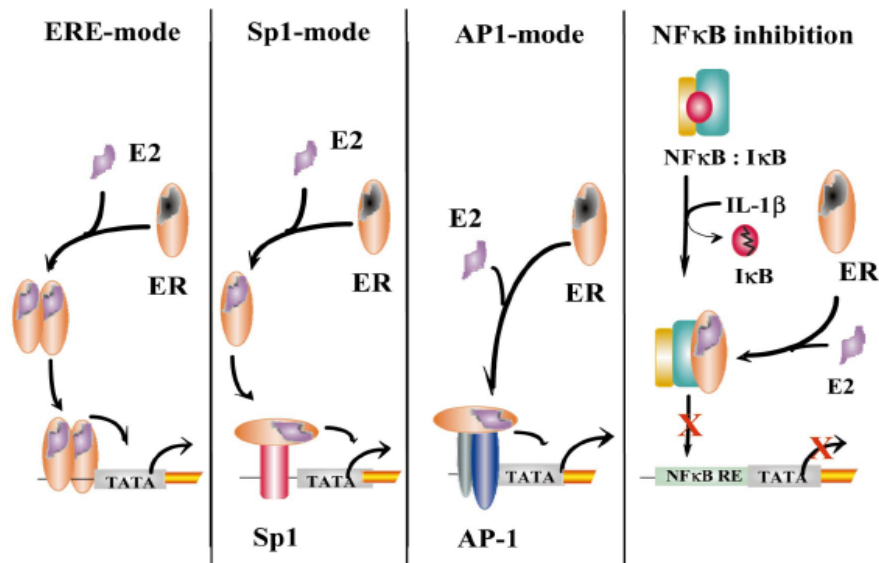


Figura 12. Modelo representativo de varias formas a través de las cuales los RE pueden modular la transcripción de genes. En el primer panel se observa la interacción clásica del receptor activado interaccionando con ERE's en el ADN. En los otros 3 paneles están las representaciones de los efectos indirectos de receptores de estrógenos interaccionando en la transcripción. Esto ocurre a través de las interacciones proteína-proteína con las proteínas, Sp1, AP1 y NF κ B (Nilsson *et al*, 2001). g

Debido a la dependencia hormonal del cáncer de mama, los RE's intracelulares han sido utilizados como marcadores de actividad tumoral y de diagnóstico. Sin embargo, su expresión en CaM pareciera ser la misma en tumores asociados o no con procesos de invasión. Además de que se han descrito alteraciones estructurales del RE en algunos pacientes con cáncer de mama, lo que hace más difícil su detección por este método (Fagua *et al*, 1993; Helm *et al*, 1989; Miksicek *et al*, 1993).

II. ANTECEDENTES

Los avances en el estudio del CaM se han incrementado debido a la detección de más indicadores pronósticos, entre ellos se destacan los relacionados con el proceso de angiogénesis, así como el estatus de la expresión de los receptores de hormonas esteroides, principalmente de estrógenos (RE positivo o negativo), debido a que los estrógenos también pueden jugar un papel importante en la regulación de la angiogénesis. Sin embargo, los mecanismos moleculares precisos por los cuales los estrógenos regulan la angiogénesis no han sido identificados (Coombes *et al* 1987; Losordo *et al*, 2001; Magennis, 1998; Soares, 2004; Thomas, 1984).

Como se ha mencionado, la mayoría de las funciones de los estrógenos son a través de la familia de REs, tanto el RE α y el RE β . Por un lado, el RE α puede inducir el efecto proliferativo en células de cáncer de mama, mientras que el RE β parece presentar actividad proliferativa o antiproliferativa, dependiendo si forma homodímeros o heterodímeros con el RE α . Se ha demostrado que la presencia del RE β causa la reducción en el número intratumoral de los vasos sanguíneos debido a que disminuye la expresión de factores pro-angiogénicos como VEGF (Hartman *et al*, 2006).

Por otro lado, estudios clínicos señalan que los individuos a los cuales se les ha detectado concentraciones elevadas de ANG en plasma, tienen mayor riesgo en el desarrollo de otros tipos de carcinomas diferentes al mamario y que el incremento en la expresión de ANG está asociado con cambios en la progresión del cáncer. Estas investigaciones señalan a la ANG como un factor blanco para nuevas drogas antineoplásicas. Se ha observado que los anticuerpos monoclonales y oligonucleótidos antisentido dirigidos contra ANG son altamente efectivos en inhibir el establecimiento de sarcoma de colón, próstata, seno, pulmón y tumores en ratones atímicos, así como el bloqueo de la translocación nuclear de ANG disminuye la

proliferación celular y la angiogénesis en cáncer de próstata (Kao *et al*, 2002; Leonidas *et al*, 2001; Yoshioka *et al*, 2006; Zhao *et al*, 2005).

En un par de reportes se asoció la expresión de la ANG con la progresión del cáncer de mama y se señaló que la ANG incrementa su expresión cuando está presente el HIF-1, pero no se encontró una correlación significativa entre la concentración de ANG y la densidad de la microvasculatura. También se señala que el incremento de la expresión de ANG en carcinomas mamarios invasivos está asociado al grado del tumor y se sugiere que altas concentraciones de ANG en sangre pueden estar correlacionadas con cáncer de mama con estatus de RE positivo (Campo *et al*, 2005; Montero *et al*, 1998).

En nuestro laboratorio determinamos, que existe una alta correlación entre el aumento en la expresión de la ANG y la disminución en la expresión del RE β en tejidos de pacientes con CaM. Observando que la expresión del ARNm-ANG es mayor en presencia de metástasis con respecto al tejido lateral de la misma paciente (tejido adyacente, el cual fue tomado como testigo, debido a que estaba aparentemente sano), que la ANG aumenta su expresión con respecto a la progresión de la enfermedad, siendo mayor en las muestras de grado tumoral tipo II (Figura 13) comparadas con tipo I y con el testigo. También se observó, que en los tumores que no presentan metástasis pero presentan mayor expresión del ARNm del RE β , la expresión del ARNm-ANG no incrementa. Sin embargo, cuando los tejidos de CaM presentan metástasis la expresión del ARNm-ANG incrementa pero no la del RE β (Figura 14); estos resultados sugieren que el gen que codifica a la ANG pueda estar regulado por los estrógenos a través del RE β (Ruvalcaba *et al*, 2006).

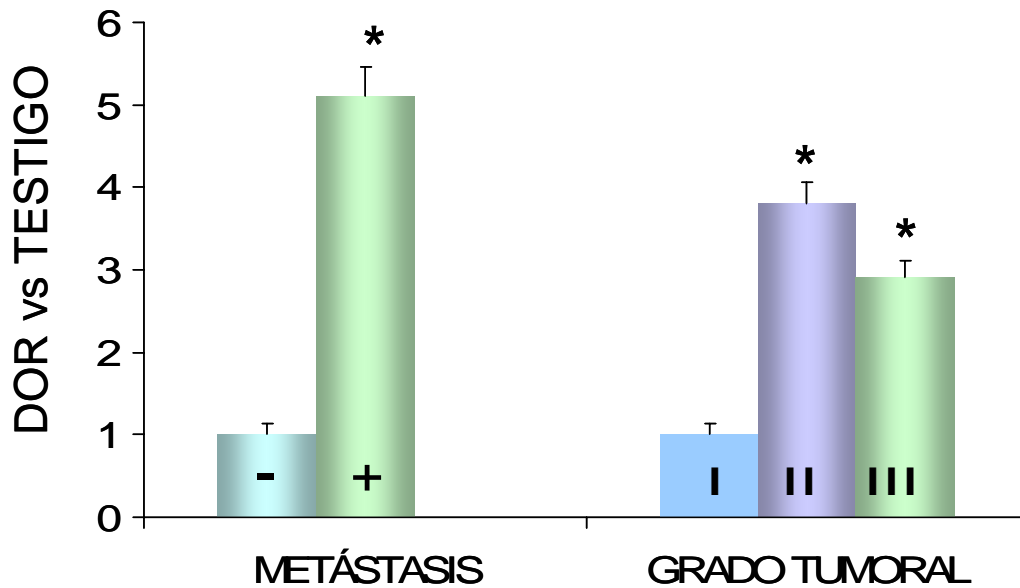


Figura 13. Expresión de ANG en tumores de cáncer de mama. Los resultados están expresados como el cociente de la densidad óptica relativa (DOR) del gen de ANG normalizado con respecto a la del gen de GPDH. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al testigo; (-) para la metástasis y I para el grado tumoral (* $p < 0.05$).

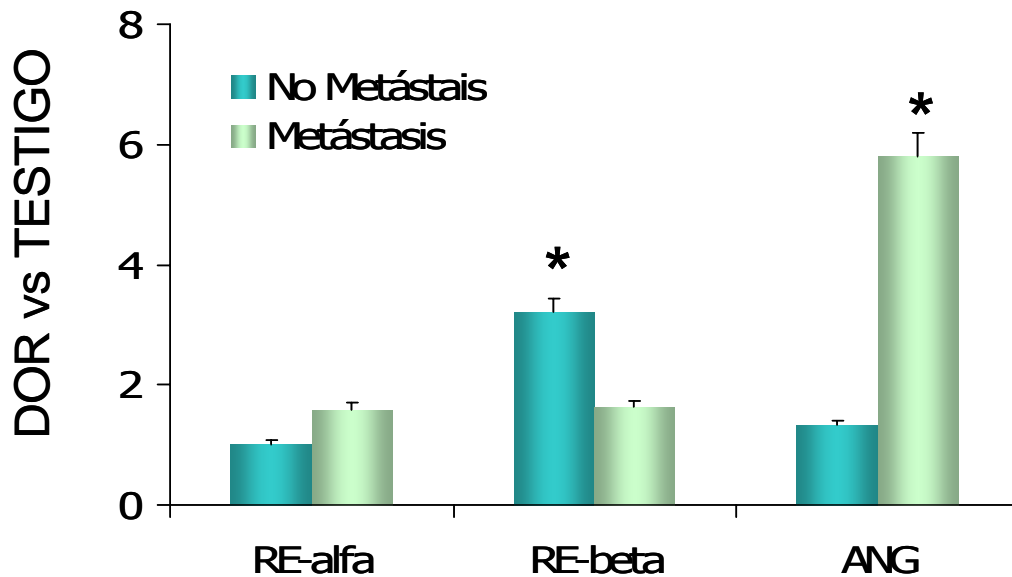


Figura 14. Expresión de $RE\alpha$, $RE\beta$ y ANG en tumores de cáncer de mama. Los resultados están expresados como el cociente de la densidad óptica relativa (DOR) del gen de ANG normalizado con respecto a la del gen de GPDH. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto a la ausencia de metástasis (* $p < 0.05$).

III. JUSTIFICACIÓN

La tasa de mortalidad en mujeres mexicanas se ha incrementado, por lo que es importante estudiar el CaM debido a que representa un desafío en materia de Salud Pública en México.

Si bien se ha demostrado que el E₂ está fuertemente asociado con el aumento en la proliferación celular, la angiogénesis y la metástasis en la mayoría de los tumores de mama. No ha sido determinado que papel juega en la regulación de la expresión de la ANG, la cual es un fuerte inductor de la angiogénesis y cuya utilidad como marcador tumoral ha sido cuestionada debido a los resultados contradictorios.

Estudios de nuestro laboratorio señalan que existe una correlación entre el aumento en la expresión de la ANG y la disminución en la expresión del RE β en tejidos de pacientes con CaM, principalmente asociada con la presencia de metástasis, lo que abre la posibilidad de que el gen que codifica a la ANG pueda estar regulada por los estrógenos.

Por tal motivo, en este trabajo de investigación nos planteamos la posibilidad de que los estrógenos pueden estar jugando un papel importante en la regulación de la expresión de la ANG, utilizando como modelo experimental las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231, las cuales se obtuvieron de un adenocarcinoma mamario de tipo epitelial. Se tomaron como modelos experimentales estas líneas celulares debido a que, la línea celular MCF-7 es de tipo tumoral, posee ambos RE's (α y β) y su crecimiento es dependiente de estrógenos; mientras que la línea celular MDA-MB-231, es metastática, solo posee el RE tipo β y su crecimiento no es dependiente de estrógenos, ambas líneas celulares representan un buen modelo de estudio para los objetivos de este trabajo de tesis.

IV HIPÓTESIS

El Estradiol regula la expresión de la Angiogenina en líneas celulares de cáncer de mama.

V OBJETIVOS:

V.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto del E₂ sobre la regulación de la expresión de la ANG en las líneas celulares de CaM MCF-7 y MDA-MB-231.

V.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la expresión basal del ARNm-ANG de las líneas celulares MCF7 y MDA MB 231.
- Analizar el efecto del E₂ sobre la expresión de ANG en las líneas celulares MCF7 y MDA MB 231.
- Determinar si el efecto del E₂ sobre la expresión de ANG es a través de los receptores intracelulares de estrógenos, utilizando el antagonista ICI 182 780.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

VI.1.- CULTIVO DE LAS LÍNEAS CELULARES.

A. Líneas celulares.

Se utilizaron las siguientes líneas celulares, las cuales son derivadas de carcinomas mamarios:

1) Células MCF-7, originalmente obtenidas por efusión pleural de una metástasis derivada de un adenocarcinoma mamario humano *in Vitro*. Estas células son tumorigénicas, con débil actividad metastática, presentan fenotipo característico de células lumbinales del epitelio ductal de la mama, su crecimiento es dependiente de la presencia de estrógenos en el medio de cultivo y son positivas para RE α y RE β .

2) Células MDA-MB 231, obtenidas de una metástasis proveniente de un adenocarcinoma mamario humano, con alta actividad metastática, su crecimiento no depende de estrógenos y son positivas para el RE β , pero no expresan el RE α .

Ambas líneas celulares, MCF-7 y MDA-MB 231, fueron amablemente proporcionadas por el Dr. Alejandro Zentella (Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición, Salvador Zubirán, Ciudad de México).

B. Medio de cultivo celular.

El medio de cultivo utilizado para ambas líneas celulares fue el de Eagle modificado por Dulbecco, libre de rojo de fenol, pH de 7.4 (DMEM; Gibco BRL, Gaithersburg, MD, EUA). El medio fue suplementado con suero de feto bovino (SFB; Gibco BRL, Gaithersburg, MD, EUA) al 10% (v/v), aminoácidos no esenciales (Gibco BRL) a una concentración final de 100 μ M, piruvato de sodio 100 μ M (Gibco BRL), L-glutamina 2 mM (Gibco BRL), una solución comercial de antibióticos compuesta por

100 U/mL de penicilina, 100 μ g/mL de estreptomicina y 250 ng/mL del antimicótico anfotericina B (Life Technologies, Gaithersburg, MD, EUA).

C. Cultivo de las líneas celulares, MCF-7 y MDA-MB 231.

De cada línea celular se sembraron 6×10^6 células en botellas de cultivo con una superficie de 75 cm^2 y se mantuvieron en incubador a 37°C , con una atmósfera húmeda de 5% de CO_2 en aire, hasta alcanzar el 80% de confluencia. Posteriormente, las células se despegaron con tripsina al 0.25% y 1 mM de EDTA. Las suspensiones celulares se centrifugaron a $286 \times g$ durante 5 min, se desechó el sobrenadante y el botón celular se resuspendió en medio de cultivo y posteriormente se volvieron a sembrar bajo las condiciones experimentales requeridas, para lo cual se fue disminuyendo la concentración del SFB contenido en el medio DMEM desde el 10% al 2.5%, hasta que finalmente se sustituyó con SFB al 2.5% y tratado con Carbón-Dextrán (SFB-C), con lo cual se eliminan los estrógenos presentes en el suero. Después de 24 h de incubación con SFB-C (tiempo "cero") se colocaron los tratamientos con E_2 (1, 100, 1000 pM) y con ICI (10,000 pM).

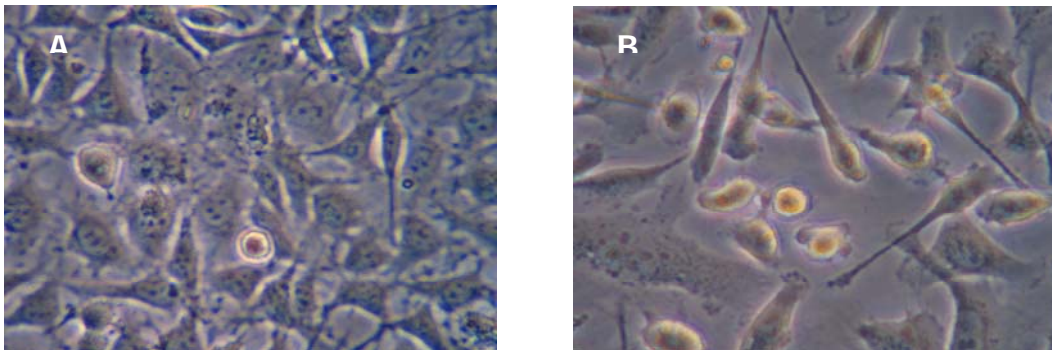


Figura 15. Microscopía óptica aumento de 1000x. A) Se observa el cultivo celular en monocapa de las células MCF7 crecidas a 85% de confluencia. B) Cultivo celular de las células MDA-MB-231 a una confluencia aproximadamente del 65%. Ambas líneas celulares se cultivaron con SFB 10%.

VI.2.-ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL ARNm.

A.- Aislamiento del ARN total.

La extracción del ARN total se realizó utilizando el estuche comercial RNeasy[®] Plus Mini, mediante el siguiente protocolo: se cultivaron las líneas de cáncer de mama MCF-7 y MDA-MB-231 hasta una densidad de 6×10^6 células, se despegaron adicionando directamente 450 μ L del buffer de lisis denominado RLT (este buffer tiene tiocinato de guanidina). Se colectó la suspensión celular con un gendarme y se traslado a un tubo de 5mL, se homogenizó repetidamente por pipeteó. Después se transfirió el homogenizado a la columna denominada "gDNA eliminator", con la finalidad de eliminar el ADN-geonómico, se centrifugó durante 30 seg a 8,000 x g; al sobrenadante obtenido se le adicionaron 450 μ L de etanol al 70%, se homogenizó y se transfirieron 700 μ L de la muestra a la columna de RNeasy, donde se centrifugó durante 15 seg a 8,000 x g. Se desechó el sobrenadante y se adicionaron 700 μ L del buffer denominado RW1 a la columna RNeasy, se centrifugó por 15 seg a 8,000 x g, se desechó el sobrenadante y se adicionaron 500 μ L del buffer denominado "RPE" para lavar la membrana de la columna, centrifugándose a 15 seg a 8,000 x g. Posteriormente se adicionaron nuevamente 500 μ L del buffer denominado RPE y se centrifugó por 2 min a 8,000 x g, se cambió el tubo colector por uno nuevo, se centrifugó a la máxima velocidad durante 1 min, se volvió a cambiar el tubo colector por un tubo de 1.5 μ L y se adicionaron 40 μ L de agua libre de nucleasas, se centrifugó por 1 min a 8,000 x g, paso que se realizó 2 veces. Finalmente se cuantificó la concentración del ARN de cada muestra por espectrofotometría a longitud de onda de 260 nm.

B. Electroforesis de ARN en geles de agarosa en condiciones desnaturalizantes.

Para observar la integridad del ARN obtenido, éste se separó con base en su peso molecular mediante la técnica de electroforesis en geles de agarosa al 1.0%

(Invitrogen; grado Biología Molecular), empleando una solución amortiguadora de ácido 3-[N-Morfolino] propanosulfónico 1X (MOPS) y formaldehído al 7% como agente desnaturizante. Previamente, cada muestra de ARN se desnaturizó por la adición de 10 μ L de la solución FMF y calentando a 75° C en un termobloque (Boekel Industries Inc., EUA) por 5 min, luego se mantuvieron en hielo por 5 min y se centrifugaron a 9,000 x g. Después del proceso de desnaturización, a cada muestra se le adicionaron 2 μ L de la solución de carga para ARN (glicerol 30%, azul de bromofenol 0.1% y xilen cianol 0.1%) y 0.2 μ L de BE (1 μ g/mL). El gel de agarosa se cubrió totalmente con buffer MOPS 1X, las muestras se depositaron en los pozos del gel y se llevó a cabo el corrimiento electroforético a 75 volts por 80 min (Davis *et al.*, 1986).

C.- Amplificación del ADNc que codifica a la ANG.

Se realizó la obtención del ADNc a partir de 50 ng de cada ARNm, seguida de la RT-PCR empleando el estuche comercial, One-Step RT-PCR Systems[®] (Promega, WI, EUA) siguiendo las indicaciones del fabricante.

El ARN extraído de las células (50 ng) se mezcló en una solución conteniendo 10 mM de cada uno de los dNTP's: dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 25mM de MgSO₄, 5u/ μ L de Transcriptasa Reversa *AMV*, Buffer de reacción 5x, 20 μ M del oligonucleótido sentido y 20 μ M del oligonucleótido antisentido, así como 5 U/ μ L ADN polimerasa *Tff*, el volumen se ajustó a 20 μ L con H₂O-DEPC, la mezcla se incubó a 45°C durante 45 min, 94°C por 2 min, para la reacción de PCR se incubó 94°C por 30 seg, 60°C por 1 min, 64 o 66 °C por 2 min (esta temperatura fue con respecto a cada uno de los oligonucleótidos, es decir, se utilizó la temperatura de 64°C para el gen de normalización y se utilizó 66°C para el gen de ANG), 68°C por 7 min y finalmente a 4°C. La reacción de RT-PCR se llevo a cabo en un termociclador TECHNE[®] (Corvette Research, Australia).

Con la finalidad de amplificar las secuencias específicas de ADNc que codifican para la ANG se utilizaron secuencias de oligonucleótidos de 20 pares de bases cada uno (Laboratorio Accesolab, México), cuyas secuencias fueron diseñadas mediante el programa computacional 'Primer 3' (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi), con base en las secuencias de los ADNc reportadas (Gene Bank; National Institute of Health, EUA) y se tomaron en cuenta la temperatura de hibridación óptima, la relación adecuada de bases GC/AT y se evitó la formación de enlaces inter e intracatenarios entre los mismos oligonucleótidos. Además, como sonda de normalización se sintetizó el ADNc de la enzima gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GPDH) humana, cuya expresión es constitutiva en estas líneas celulares. En la siguiente tabla se muestran las secuencias de los oligonucleótidos de cada uno de los genes que fueron estudiados y los productos de PCR (amplicones) respectivos en pb.

Tabla 2. Secuencias de los oligonucleótidos utilizados para amplificar el ARNm-ANG.

Genes	Secuencia de oligonucleótidos	Tamaño del amplicón (Temperatura melting)
ANG	Sentido 5'-ATG GCA ACA AGC GCA GCA TC-3' Antisentido 5'- ATC CCA GTG GAC AGG TAA GC -3	208 pb (66°C)
GPDH	Sentido 5'-TTC GCT CTC TGC TCC TCC TG-3' Antisentido 5'-ACC CGT TGA CTC CGA CCT TC-3	557 pb (64°C)

Los productos de PCR se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 1.2 % (p/v) y se utilizó como buffer de corrimiento TBE al 0.5X (0.5 M Tris Base, 0.5 M ácido bórico, 10 mM EDTA: etilendiamino tetracético) a 80 Volts por 60 minutos. Al final del corrimiento electroforético, los productos de PCR se visualizaron mediante el colorante fluorescente bromuro de etidio (1 µg/mL), el cual se intercala entre el ADN y emite luz a 600 nm (anaranjado) al ser estimulado con luz ultravioleta

(fluorescencia). Las imágenes de cada una de las bandas se analizaron por densitometría en el sistema de análisis de imágenes Gel Logic 200® (Kodak, EUA). Los resultados se expresan en número de píxeles (densidad óptica relativa; DO) del gen de interés con respecto al gen de normalización GPDH.

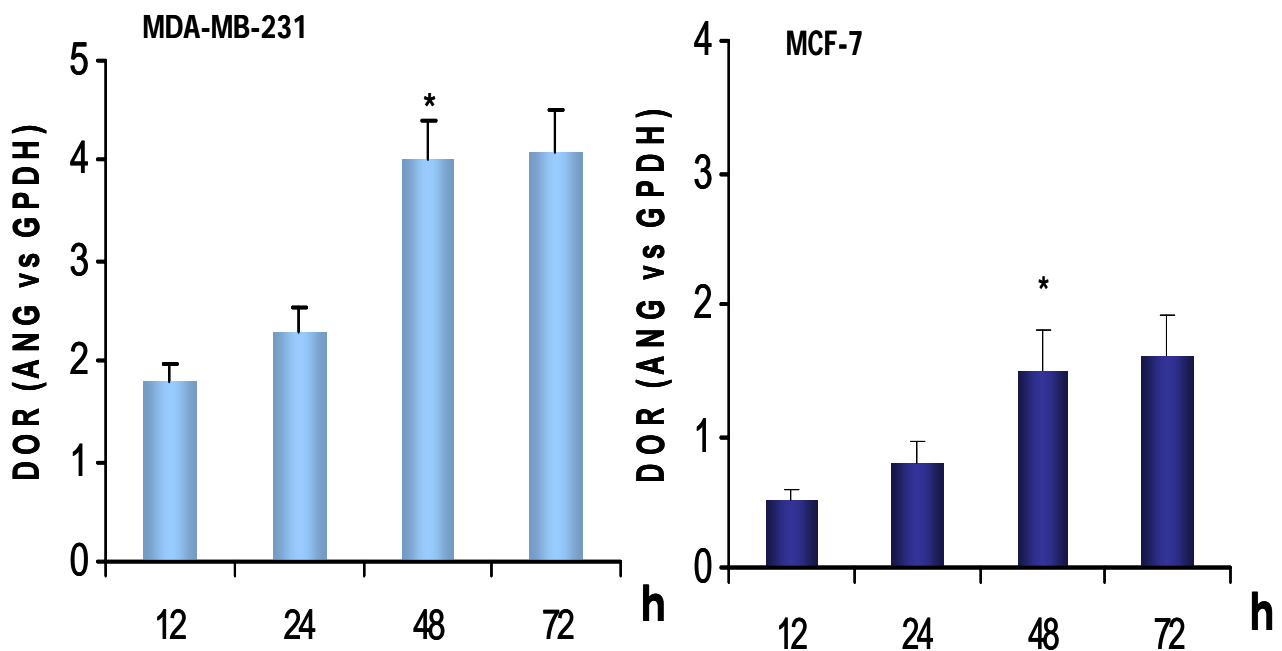
VI.3. Análisis estadístico.

La comparación de los grupos experimentales se realizó por análisis de varianza de una vía y las diferencias estadísticas entre grupos se establecieron por la prueba de t de Student, utilizando el programa computacional SigmaStat (Jandel Corporation, San Rafael, CA, USA) y las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0.05$. Los experimentos se realizaron tres veces por duplicado.

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

VII.1. Expresión basal del ARNm de ANG en líneas celulares de cáncer de mama.

Debido a que no existen reportes en la literatura especializada con respecto a la expresión de ANG en las líneas celulares estudiadas (MCF7 y MDA-MB-231), el primer paso fue cuantificar su expresión en condiciones basales. La expresión del ARNm-ANG en las líneas celulares de cáncer de mama MCF-7 y MDA-MB-231 se aisló de los extractos de células cultivadas después de 12, 24, 48 y 72 h en medio DMEM con SFB al 10%.

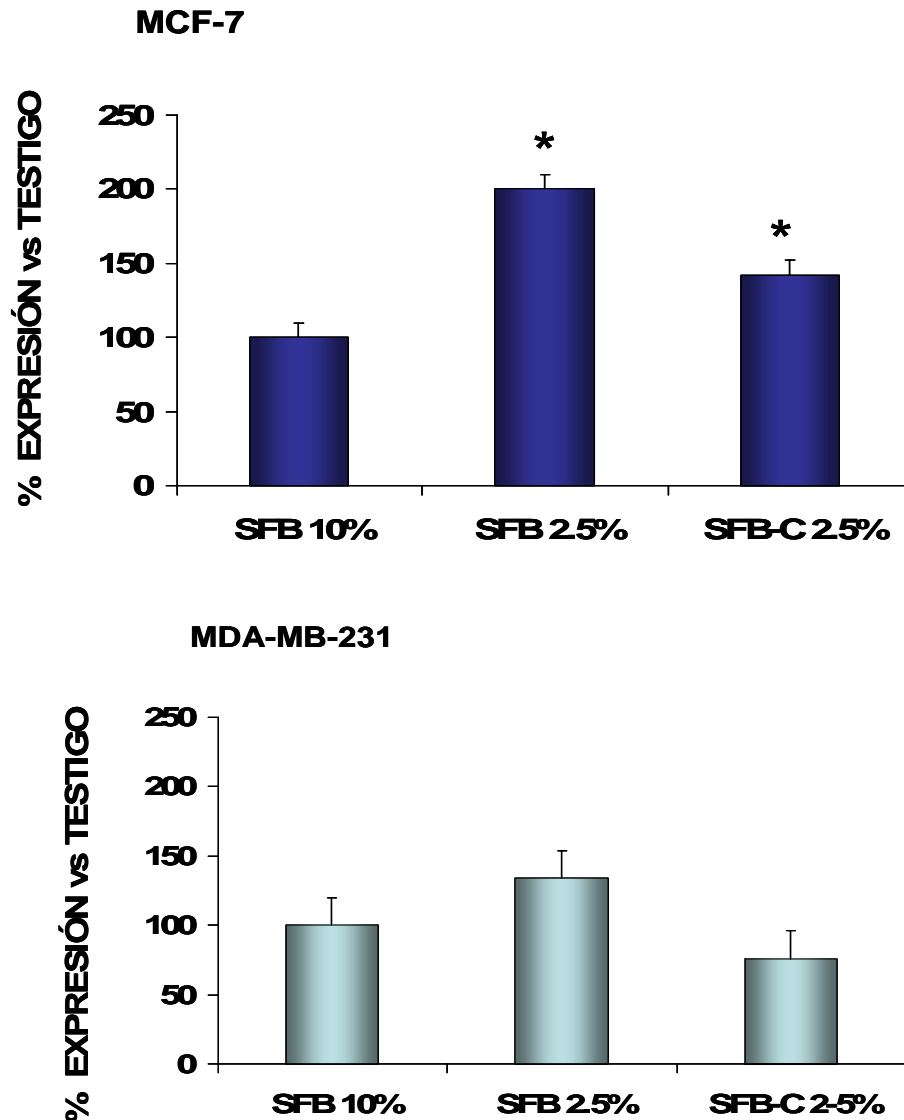


Gráfica 1. Aumento en la expresión del ARNm de ANG con respecto al tiempo en células MCF-7 y MDA-MB-231. Ambas líneas celulares se cultivaron en medio DMEM conteniendo SFB al 10% durante 12, 24 y 48 h. En ambos casos se observa que el incremento en la expresión de ARNm-ANG es en función del tiempo y que la velocidad de síntesis es semejante, aunque la cantidad es mayor en las células MDA-MB-231. Los resultados están expresados como el cociente de la densidad óptica relativa (DOR) del gen de ANG normalizado con respecto a la del gen de GPDH. Cada punto representa el promedio de tres experimentos diferentes analizados por duplicado y la desviación estándar está indicada por las barras. Los asteriscos indican diferencias significativas (* $p < 0.05$ vs 12 h).

Los resultados demuestran que ambas líneas celulares sintetizan ARNm-ANG en forma dependiente del tiempo, acumulándose después de 48h en comparación con lo producido por las células a las 12h ($p < 0.05$). En las células MDA MB 231, la síntesis del ARNm-ANG se incrementa casi 2 veces después de 48 h de incubación, con respecto al tiempo de 12 h, lo que representa 2.6 veces más ARNm-ANG que lo producido por las células MCF-7, en el mismo lapso de tiempo. Cuando se comparo en la línea celular MCF-7, 12 h con 24 h, se observó que hay un incremento en la expresión de ANG, pero no hay diferencias significativas, sucediendo lo mismo al comparar 24 h con 48 h. Mientras que en la línea celular MDA-MB-231, se observó que hay un incremento de 1.6 veces cuando se comparó 24 h con 48 h, sin embargo al comparar 12 h con 24 h no hubo cambios significativos. En ambos casos se observa que el incremento en la expresión de ARNm-ANG es en función del tiempo y que la velocidad de síntesis es semejante, aunque la cantidad es mayor en las células MDA-MB-231, además se observa que se mantiene el incremento en la expresión del ARNm-ANG a 72 h, pero no hubo diferencias significativas ($p > 0.05$) con respecto a 48h.

Con la finalidad de determinar el efecto de la privación del SFB y de los esteroides contenidos en éste, sobre la expresión del ARNm-ANG en ambas líneas celulares, las células se cultivaron por 24 h en medio con concentraciones decrecientes de esteroides exógenos. Es decir, del 10% de SFB se disminuyó la concentración hasta el 2.5% y finalmente el SFB al 2.5% se sustituyó por SFB-C al 2.5% (Gráfica 2).

Se observó que la expresión del ARNm-ANG aumentó considerablemente (200%) en la línea celular MCF-7, cuando se incubaron con SFB al 2.5% y en menor proporción al incubarlas con SFB-C (50%), con respecto al SFB al 10% ($p < 0.05$). Este cambio puede ser debido a que la disminución de la concentración de los esteroides, así como con su eliminación por el tratamiento del SFB-C, el cual elimina las moléculas lipofílicas pequeñas.



Gráfica 2. Expresión del ARNm-ANG con respecto a la concentración de esteroides exógenos presentes en el medio de cultivo. Ambas líneas celulares se cultivaron con diferentes concentraciones de SFB (10%, 2.5% y 2.5% con SFB-C) durante 24 h. En la línea celular MCF-7 se observa un incremento significativo en la expresión del ARNm-ANG cuando se disminuye la concentración del SFB aproximadamente 2 veces y con SFB-C de 1.5 veces, con respecto a las células cultivadas en medios con SFB al 10% (Testigo), considerado como el 100% de expresión. Cada punto es el promedio de tres experimentos diferentes analizados por duplicado y la desviación estándar está indicada por las barras. Los asteriscos indican diferencias estadísticas significativas (* $p < 0.05$ vs Testigo).

Por otro lado, la disminución en la concentración de esteroides exógenos en el medio de cultivo de las células MDA-MB-231 tendió a aumentar en la expresión del ARNm-ANG, sin ser estadísticamente significativo con respecto al SFB 10%, considerado como testigo.

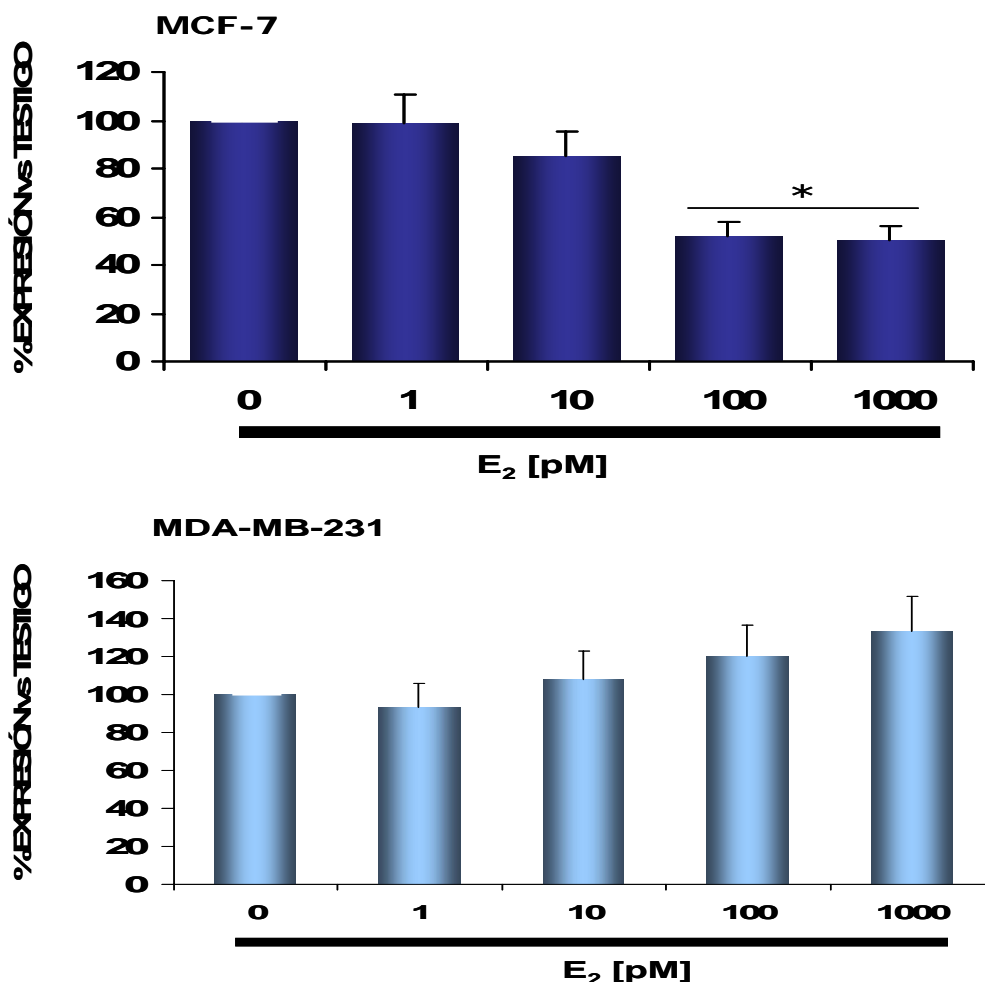
El hecho de que la privación de esteroides exógenos haya tenido un efecto marginal sobre la expresión del ARNm-ANG en las células MDA-MB-231 se puede relacionar con su independencia en el crecimiento con respecto a la presencia de estrógenos en el medio, lo que hace suponer que algunos genes, como pudiera ser el caso de ANG, pierden su regulación y son expresados constitutivamente.

Debido a los cambios en la expresión del ARNm-ANG con respecto a la concentración del suero, todos los demás experimentos, en ambas líneas celulares, se realizaron en medio DMEM conteniendo SFB-C con 24 h de preincubación, a lo cual se denominó tiempo cero.

VII.2. Efecto del E₂ sobre la expresión del ARNm que codifica para ANG en líneas celulares de cáncer de mama.

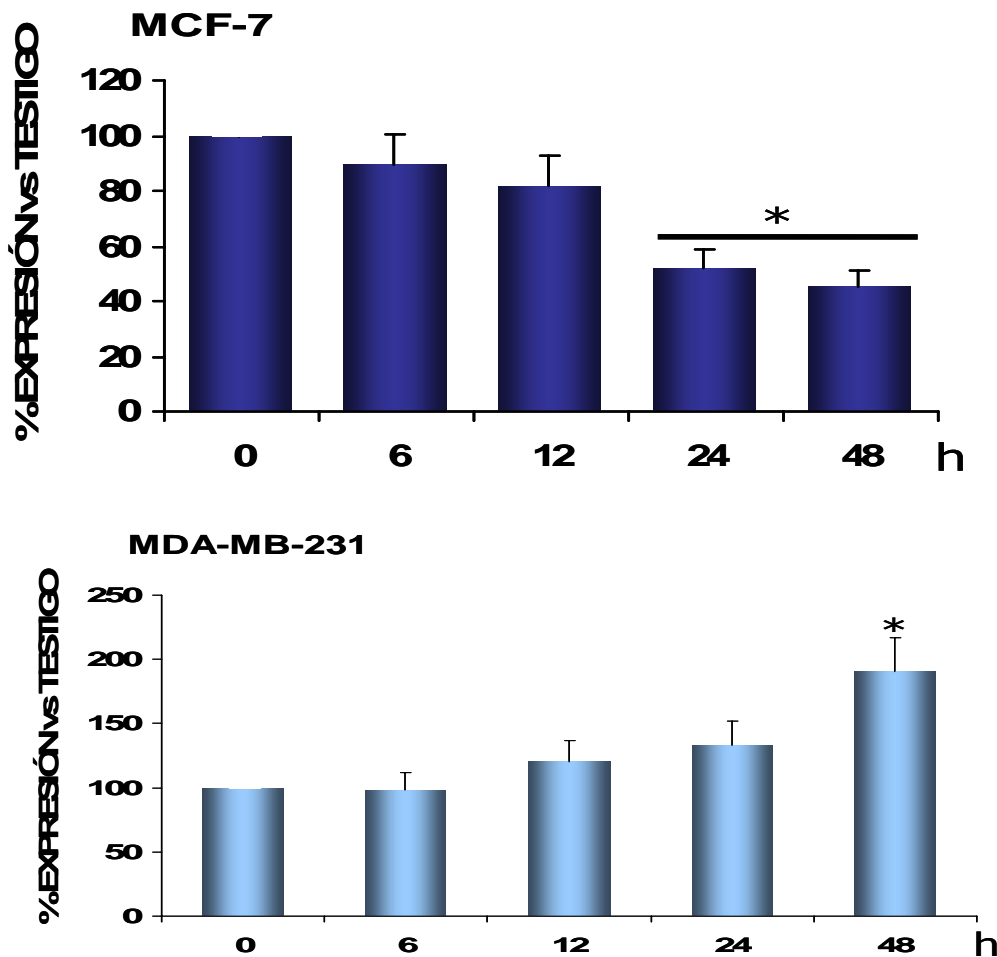
En la gráfica 3 se muestra el efecto del E₂ sobre la síntesis del ARNm-ANG mediante curvas dosis-respuesta, utilizando cuatro diferentes concentraciones (1, 10, 100 y 1000 pM) de E₂ durante 24 h de incubación. En la línea celular MCF-7, se observó que solamente la incubación con concentraciones fisiológicas altas de E₂ (100 y 1000 pM) disminuyeron en más del 50% la expresión del ARNm-ANG, la cual fue significativa al compararse con el vehículo ($p < 0.05$). Mientras que en la línea celular MDA-MB-231, el E₂ induce un ligero efecto de estimulación en la síntesis del ARNm-ANG, siendo en la concentración de 1000 pM de E₂ del 35% con respecto al vehículo, pero sin diferencias estadísticas.

En conjunto, estos resultados sugieren que el E₂, incubado por 24 h, puede inhibir la expresión de ANG en células que expresan ambos RE, como en el caso de la línea celular MCF-7; mientras que este esteroide parece no tener efecto significativo sobre la síntesis del ARNm-ANG en células que carecen del RE α (MDA-MB 231).



Gráfica 3. Curva dosis respuesta de E₂ sobre la expresión de ANG en células MCF-7 y MDA-MB-231. Las células fueron incubadas con concentraciones crecientes de E₂ (1-1000 pM) durante 24 h. En las células MCF-7, altas concentraciones de E₂ inhiben la síntesis del ARNm-ANG; mientras que la línea celular MDA-MB-231, el E₂ induce pequeños incrementos de la expresión del ARNm-ANG, pero sin diferencias estadísticas. Los resultados están expresados como el porcentaje de expresión con respecto al testigo (Vh) que representa el 100% de expresión. Cada punto es el promedio de tres experimentos diferentes analizados por duplicado y la desviación estándar está indicada por las barras. Los asteriscos indican diferencias estadísticas significativas (*p<0.05 vs testigo).

Con base en los resultados obtenidos en el experimento anterior y con la finalidad de determinar si la síntesis del ARNm-ANG cambia en función del tiempo (0, 6, 12, 24 y 48 h), se realizaron experimentos donde se incubaron 100 pM de E₂ en la línea celular MCF-7 y de 1000 pM de E₂ en las células MDA-MB 231 (Gráfica 4).



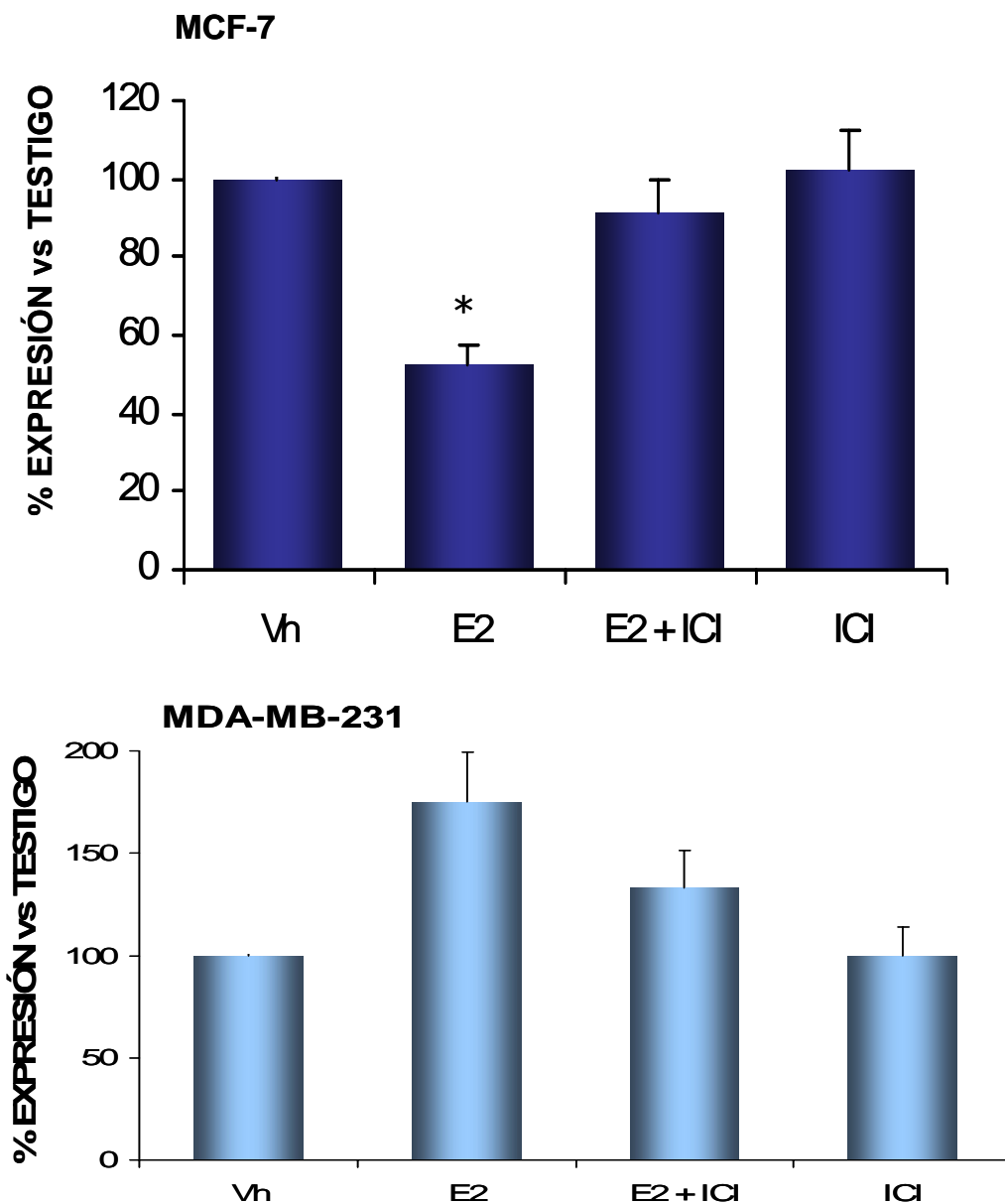
Gráfica 4. Curvas de expresión del ARNm-ANG en función del tiempo de incubación con E₂. Las células MCF-7 se incubaron con 100 pM de E₂ durante diferentes periodos de tiempo, observándose que la disminución en la expresión del ARNm-ANG es significativa después de 24 y 48 h de incubación. En la línea celular MDA-MB-231, incubadas con 1000 pM de E₂ durante diferentes periodos de tiempo, se determinó que el aumento en la expresión del ARNm-ANG es significativa solamente después de 48 h de incubación con el E₂. Los resultados están expresados como el porcentaje de expresión con respecto al testigo (tiempo cero) que representa el 100% de expresión. Cada punto es el promedio de tres experimentos diferentes analizados por duplicado y la desviación estándar está indicada por las barras. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (*p<0.05 vs tiempo cero).

En la línea celular MCF-7 se determinó que el efecto inhibitorio máximo del E₂ sobre la expresión del ARNm-ANG se observa tanto a 24 como a 48 h de incubación, sin ser estadísticamente diferentes entre sí. Por otro lado, en la línea celular MDA-MB-231 se evidenció un ligero aumento (menor a 2X), pero estadísticamente significativo, en la síntesis del ARNm-ANG cuando las células se incuban con 1000 pM de E₂ por 48 h, con respecto al tiempo 0 (p<0.05).

VII.3. Efecto del anti-estrógeno ICI sobre la expresión del ARNm-ANG en líneas celulares de cáncer de mama.

Una vez que se determinó que el E₂ presenta efectos opuestos sobre la expresión del ARNm-ANG en las dos líneas celulares utilizadas (MCF-7 y MDA-MB-231), se procedió a determinar si el efecto observado es a través de los RE intracelulares, los cuales son bloqueados con el agente anti-estrogénico denominado ICI 182,780 (ICI). Las células MCF-7 se incubaron durante 24h con 100 pM de E₂ en ausencia o presencia de ICI (100 nM), mientras que las células MDA-MB 231 se incubaron por 48 h con 1000 pM de E₂, en ausencia o presencia de ICI (Gráfica 5).

Se determinó que la sola incubación con 100 nM de ICI 182 780 no modifica la expresión del ARNm-ANG en ambas líneas celulares, ya que su expresión es igual a la del testigo. Sin embargo, el efecto inhibitorio del E₂ sobre la expresión del ARNm-ANG en células MCF-7 fue totalmente bloqueado por la incubación con el antiestrógeno ICI, sugiriendo que el E₂ presenta su efecto a través de uno o ambos RE's. En forma opuesta, en la línea celular MDA-MB-231 no se bloquea el efecto del E₂ sobre la expresión del ARNm-ANG cuando se incuban conjuntamente el anti-estrógeno ICI y 1000 nM de E₂ durante 48 h.



Gráfica 5. Expresión de ANG en presencia del anti-estrógeno ICI. Las células MCF-7 fueron tratadas durante 24h con 100 pM de E₂ y 100 nM del anti-estrógeno ICI 182,780 (ICI), observándose que éste bloquea el efecto inhibitorio del E₂ sobre la expresión del ARNm-ANG. Por otro lado, las células MDA-MB-231 fueron tratadas durante 48h con 1000 pM de E₂ en presencia de ICI, mismo que no es capaz de revertir el efecto estimulador del E₂ sobre la expresión del ARNm-ANG. Los resultados están expresados como el porcentaje de expresión con respecto al testigo (Vh) que representa el 100% de expresión. Cada punto es el promedio de tres experimentos diferentes analizados por duplicado y la desviación estándar está indicada por las barras. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (*p<0.05 vs testigo).

Estos resultados sugieren que los mecanismos que controlan la expresión de ANG dependen de las características de cada línea celular y de la presencia diferencial de los RE intracelulares. Con este estudio no se pueden descartar efectos de tipo no genómico a través de receptores de estrógenos presentes en la membrana plasmática de las células que, en conjunto con los efectos genómicos, pueden regula la expresión de ANG en forma indirecta.

VIII. CONCLUSIONES

Se ha observado que un considerable número de tumores de mama son dependientes de estrógenos, ya que estos interactúan con los RE's nucleares para regular la expresión de un número importante de genes involucrados en la progresión de las células del tejido mamario (Guo *et al*, 2003). Por esta razón, muchas de las terapias contra el CaM se basan en el bloqueo de la actividad estrogénica; sin embargo, uno de los problemas más importantes en la lucha contra el cáncer de mama es la resistencia a la hormonoterapia, en particular al uso de moléculas con actividad antiestrogénica (p. ej. Faslodex –ICI 182,780) o bloqueadores de RE (p. ej. Fulvestran), con la finalidad de inhibir la actividad mitogénica y proliferativa de los estrógenos.

Si bien los estrógenos han sido señalados como agentes netamente pro-angiogénicos actuando a través de múltiples mecanismos directos, por aumento en la expresión VEGF, e indirectos, al disminuir la expresión de moléculas con actividad antiangiogénica. Diversos autores señalan que a pesar de que existan altas concentraciones de estrógenos, el incremento en la expresión del RE β se asocia con la disminución en el crecimiento del tumor, asociado con disminución en la neovascularización, debido a que su actividad puede inducir la disminución en la expresión de factores pro-angiogénicos como VEGF (Hartman *et al*, 2006). En este caso, no se ha reportado que los estrógenos puedan modular la expresión de otros factores pro-angiogénicos, como podría suceder con la ANG.

Por otro lado, se ha observado que la ANG está asociada con aumento en la angiogénesis y la metástasis, sugiriendo que su expresión se incrementa en condiciones de hipoxia, en respuesta a la presencia del HIF-1, pero no se ha demostrado que exista una correlación significativa entre altas concentraciones de ANG y la densidad de la microvasculatura, por lo que cuantificar la concentración de ANG en tejido o circulante no se ha considerado como un factor pronostico en el

cáncer de mama. Si bien se propone que el aumento en la expresión de ANG en carcinomas invasivos de mama está asociada al grado del tumor y al estatus del RE (Campo *et al*, 2005; Montero *et al*, 1998) no se han estudiado los mecanismos que regulan su expresión en células de cáncer de mama.

El objetivo de este trabajo de investigación fue determinar si la expresión de la ANG, la cual fue medida a través de su ARNm, puede ser regulada por los estrógenos y se encontró que las células de carcinoma mamario (MCF-7 y MDA-MB-231) son capaces de expresarla en altas concentraciones después de 48h. Este fue el período de tiempo más largo estudiado en el presente trabajo de investigación y es el primer reporte científico donde se determina la expresión de ANG en líneas celulares de carcinoma mamario. Al comparar la cantidad del ARNm-ANG que producen estas células, se determinó que fue semejante al detectado en tejidos de carcinoma mamario con metástasis, lo cual refuerza la idea de que ambas líneas celulares son metastáticas, aunque las células MCF-7, que se consideran tumorogénicas más que metastáticas, la producen en menor proporción (manuscrito en preparación).

En la segunda parte del trabajo de investigación se determinó el efecto de la disminución en la concentración del suero (SFB) adicionado al medio de cultivo, así como la eliminación de los esteroides endógenos, adsorbidos por la suspensión de carbón/dextrán. Estos experimentos fueron de suma importancia para demostrar que el efecto de tipo estrogénico sobre la expresión del ARNm-ANG, se debió exclusivamente a la adición del E₂ exógeno al medio de cultivo.

Los resultados obtenidos de estos experimentos demuestran que en el suero existen diferentes factores que pueden regular la síntesis del ARNm-ANG en las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231, además se observa que existen diferencias con respecto en la respuesta de cada una de ellas en relación a los cambios en el medio de cultivo. Con base en los cambios observados se determinó que todos los experimentos posteriores serían realizados con las células crecidas en medio de cultivo conteniendo 2.5% de SFB-C por 24h antes de iniciar los tratamientos.

Basándonos en los resultados anteriores, se realizaron los estudios en función de la concentración y del tiempo de incubación para analizar si el E₂ puede regular la expresión del ARNm-ANG en las líneas celulares señaladas. Se determinó que este esteroide, a concentraciones de 100-1000 pM e incubado por 24-48 h, es capaz de inhibir significativamente la expresión del ARNm-ANG en la línea celular MCF-7 ($p < 0.05$), la cual expresa ambos receptores de estrógenos. Mientras que en la línea celular MDA-MB-231. Las altas concentraciones de E₂ (1000 pM) incubado durante tiempos prolongados, es decir a 48h, fueron capaces de incrementar significativamente la expresión del ARNm-ANG. Estos datos sugieren que los mecanismos moleculares que regulan la expresión de ANG son múltiples y dependen de los tipos celulares, en particular la presencia de los RE. Nuestros resultados concuerdan con los estudios en tejidos humanos realizados en nuestro laboratorio, los cuales señalan que existe una fuerte correlación entre el aumento en la expresión de la ANG y la disminución en la expresión del RE β en tejidos de pacientes con cáncer de mama, principalmente asociada con la edad y la presencia de metástasis; partiendo de la idea de que las células MDA-MB-231 tienen mayor capacidad metastásica que las células MCF-7.

Se realizaron experimentos con el propósito de demostrar que la administración exógena del E₂ regula la expresión del ARNm-ANG a través de los RE's intracelulares, los cuales se bloquearon utilizando el anti-estrógeno ICI 182,780. Los resultados obtenidos muestran que solamente las células MCF-7 fueron susceptibles al efecto del antiestrógeno, el cual pudo bloquear totalmente el efecto inhibitorio del E₂ sobre la síntesis del ARNm-ANG. Como era de esperarse, el ICI no modificó su expresión en la línea celular MDA-MB-231.

A partir de los resultados obtenidos en este trabajo de investigación podemos señalar que el patrón de expresión del ARNm-ANG es diferente en ambas líneas celulares, que concentraciones fisiológicas altas (100 y 1000 pM) de E₂ inhiben su

expresión en las células MCF-7, mientras que la concentración de 1000 pM de E₂ aumenta su expresión en las células MDA-MB-231.

IX. PERSPECTIVAS

- ✓ Para correlacionar los datos de la expresión del ARNm-ANG proponemos determinar la concentración de la proteína ANG por medio de un Western Blot.
- ✓ Con el fin de determinar que los efectos del E₂ son por medio de alguno de los RE's, se propone como experimentos próximos a realizar que se sobre-exprese el RE α en las células MDA-MB-231 y se determine su efecto en la expresión de ANG o bien, inhibir el RE β en las células MCF-7.
- ✓ Se sugiere correlacionar las muestras de CaM con la administración de TRH en mujeres post-menopausicas.
- ✓ Para los estudios *in vivo* se propone inocular a ratones atimicos con células MCF-7 y posteriormente aplicarles tratamientos con E₂ e ICI. Para determinar el efecto de los tratamientos, se extraerían los tumores que se formaron en los ratones y se analizarían las muestras por medio de la técnica de inmuno-histoquímica, observando la formación de vasos sanguíneos.

X. REFERENCIAS

1. Acconcia F, Kumar R (2006). Signaling regulation of genomic and nongenomic functions of estrogen receptors. *Cancer Letters* 238(1):1-14.
2. Barrón GA, Arias MJ, Castro RI. (2001). Antiestrógenos: mecanismo de acción y aplicaciones clínicas. *Salud Pública Mexicana*. 43:577-584.
3. Beatrice A, Howard, Barry A, Gusterson. (2000). Human Breast Development. *J Mammary Gland Biol and Neoplasia*. 5 (2).
4. Bond MD, Strydom DJ, Vallee BL. (1993). Characterization and sequencing of rabbit, pig and mouse angiogenins: discernment of functionally important residues and regions. *Biochim Biophys Acta (incompleta)* 1162(1-2):177-186.
5. Bonnie JD, Kenneth SK. (2006). Estrogen receptors and human disease. *J Clin Invest* 116:561-570.
6. Bos JL. (1989). ras oncogenes in human cancer. *Cancer Res*. 49:4682-4689.
7. Campo L, Turley H, Han C, Pezzella F, Gatter K, Harris A. (2005). Angiogenin is up-regulated in the nucleus and cytoplasm in human primary breast carcinoma and is associated with markers of hypoxia but not survival. *J Pathol* 205:585-591.
8. Carmeliet P. (2005). Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature*. 932-936.
9. Ceriani RL. (1974). Proceedings: Hormones and other factors controlling growth in the mammary gland: a review. *J Invest Dermatol*. 63(1):93-108.
10. Clarke R. (2000). Introduction and Overview: Sex Steroids in the Mammary Gland. *J Mammary Gland Biol and Neoplasia*. 5(3):245-250.
11. Clarke RB. (2003). Steroid receptors and proliferation in the human breast. *Steroids* 68:789-794.
12. Coombes RC, Powles TJ, Berger U, Wilson P, McClelland RA, Gazet JC, Trott PA, Ford HT. (1987). Prediction of endocrine response in breast cancer by immunocytochemical detection of oestrogen receptor in fine-needle aspirates. *Lancet*. 2(8561):701-703.
13. Cópola F, Nader J, Aguirre R. (2005). Metabolismo de los estrógenos endógenos y cáncer de mama. *Rev Med Uruguay*; 21: 15-22.

14. D'Alessio G. (1993). New and cryptic biological messages from RNases. *Trends Cell Biol.* 3(4):106-109.
15. Dabrosin C. (2005). Sex steroid regulation of angiogenesis in breast tissue. *Angiogenesis.* 8:127-136.
16. Davis LG, Dibner MD, Battey JF. (1986). *Basic methods in Molecular Biology.* Editorial Elsevier Science Publishing Co. Inc. N Y. USA.
17. Deroo BJ and Korach KS. (2006). Estrogen receptors and human disease. *J Clin Invest.* 116(3):561-570.
18. Doisneau-Sixou SF, M Sergio C, Carroll JS, Hui R, Musgrove EA, Sutherland RL. (2003). Estrogen and antiestrogen regulation of cell cycle progression in breast cancer cells. *Endocr Relat Cancer.* 10:179–186.
19. Ellis LM. (2004). Angiogenesis and its role in colorectal tumor and metastasis formation. *Semin Oncol.* 31(6 Suppl 17):3-9.
20. Eppenberger, Kueng W, Schlaeppli JM, Roesel JL, Benz C, Mueller H, Matter A, Zuber M, Luescher K, Litschgi M, Schmitt M, Foekens JA, Eppenberger-Castori S. (1998). Markers of tumor angiogenesis and proteolysis independently define high- and low-risk subsets of node-negative breast cancer patients. *J Clin Oncol.* 16(9):3129-3136.
21. Fox S, Leek RS, Weekes MP, Whitehouse RM, Gatter KC, Harris AL. (1995). Quantitation and prognostic value of breast cancer angiogenesis: comparison of microvessel density, chalkley count, and computer image analysis. *J Pathol.* 177:275-283.
22. Fox SB. (1997). Tumour angiogenesis and prognosis. *Histopathology.* 30, 294-301.
23. FUCAM (2005). Fundación Mexicana de Fomento Educativo para la Prevención y Detección Oportuna del Cáncer de Mama. www.fucam.org
24. Fugua SAW, Chamness GC, McGuire WL. (1993). Estrogen receptor mutations in breast cancer. *J Cell Biochem.* 51:135-143.
25. Glenn TC, Glenn SJ. (1994). Rapid elution of DNA from agarose gels using polyester plug spin insert (PEPSIs). *Trends in Genetics.* 10: 344-350.
26. Guo P, Fang Q, Tao HQ, Schafer CA, Fenton BM, Ding I, Hu B, Cheng SY. (2003). Overexpression of Vascular Endothelial Growth Factor by MCF-7 Breast Cancer Cells Promotes Estrogen-independent Tumor Growth *in vivo* *Cancer Research.* 63(15):4684-91.
27. Gusterson BA, Machin LG, Gullick WJ, Gibbs NM, Powles TJ, Elliot C, Ashley S, Monaghan

- P, Harrison S. (1988). c-erb B2 expression in benign and malignant breast disease. *Br J Cancer*. 58:453-457.
28. Hall JM, Lee MK, Newman B, Horrow JE, Anderson LA, Huey B, King MC. (1990). Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q 21. *Science*. 250: 1684-1689.
29. Harlozinska A. (2005) Progress in molecular mechanisms of tumor metastasis and angiogenesis. *Anticancer Res*. 25(5):3327-3333.
30. Hartman J, Lindberg K, Morani A, Inzunza J, Ström A, Gustafsson JA. (2006). Estrogen receptor beta inhibits angiogenesis and growth of T47D breast cancer xenografts. *Cancer Research*. 66(23):11207-11213.
31. Helm HJ, Helle MJ, Kallioniemi OP, Isola JJ. (1989). Immunohistochemical determination of estrogen and progesterone receptors in human breast carcinoma: correlation with histopathology and DNA flow cytometry. *Cancer*. 63: 1761-1767.
32. Hinck L and Silberstein GB. (2005). The mammary end bud as a motile organ. *Breast Cancer Res*. 7(6):245-251.
33. Homer JJ, Greenman J, Stafford ND. (2002). Circulating angiogenic cytokines as tumour markers and prognostic factors in head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Otolaryngol Allied Sci*. 27(1):32-37.
34. Hu GF, Chang SI, Riordan JF, Vallee BL. (1991). An angiogenin-binding protein from endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 88, 2227-2231.
35. Hu G, Riordan J, Vallee B. (1997). A putative angiogenin receptor in angiogenin-responsive human endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 94,2204-2209.
36. Hyder S, Nawaz Z, Chiappetta C, Stancel G. (2000). Identification of functional estrogen response elements in the gene coding for the potent vascular endothelial growth factor. *Cancer Res* 60:3183–3190.
37. INEGI. (2008). Estadísticas a propósito del día internacional de la mujer. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática.
38. Jadeski LC, Hum KO, Chakraborty C, Lala PK. (2000) Nitric oxide promotes murine mammary tumour growth and metastasis by stimulating tumour cell migration, invasiveness and angiogenesis. *Int J Cancer*. 86(1):30-39.
39. Jordan VC. (1993). A current review of tamoxifen for the treatment and prevention of breast cancer. *Br J Pharmacol*. 110:507-517.

40. Kao R, Jenkins J, Olson K, Key M, Fett J, Shapiro R. (2002). A small-molecule inhibitor of the ribonucleolytic activity of human angiogenin that possesses antitumor activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99:15,10066-10071.
41. Kelsey JL, Gammon MD, John EM. (1993). Reproductive factors and breast cancer. *Epidemiol Rev.* 15: 36-47.
42. Kirscher MA. (1979). The role of hormones in the development of human breast cancer. En: *Breast Cancer 3: Advances in Research and Treatment, Current Topics.* Plenum Press, New York, pp 199-226.
43. Kuale G, Heuch I. (1987). Lactation and cancer risk: is there a relation specific to the breast cancer. *J Epidemiol Comm Health.* 42: 3037.
44. Leonidas D, Chavali G, Jardine A, Li S, Shapiro R, Acharya R. (2001). Binding of phosphate and pyrophosphate ions at the active site of human angiogenin as revealed by X-ray crystallography. *Protein Sci.* 10, 1669-1676.
45. López RO, Lazcano PS, Tovar G, Hernández AM. (1997). La epidemia de cáncer mamario en México ¿Consecuencia de la transición demográfica? *Salud Publ Méx.* 39: 259-265.
46. Losordo DW, Isner JM. (2001). Estrogen and Angiogenesis a Review. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 21:6-12.
47. Neville MC. (2001). Anatomy and physiology of lactation. *Pediatr Clin North Am.* 48(1):13-34.
48. Nilsson S, Mäkelä MS , Treuter E, Tujague M, Thomsen J, Andersson RG, Enmark E, Pettersson K, Warner M, Gustafsson JA. (2001). Mechanisms of Estrogen Action. *Physiol Rev.* 81(4):1535-1565.
49. Maes P, Damart D, Rommens C, Montreuil J, Spik G, Tartar A. (1988). The complete amino acid sequence of bovine milk angiogenin. *FEBS Lett.* 241(1-2):41-5.
50. Magennis DP. (1998). Angiogenesis: a new prognostic marker for breast cancer. *Br J Biomed Sci.* 55(3):214-220.
51. Medina D. (2005). Mammary developmental fate and breast cancer risk. *Endocr Relat Cancer.* 12: 483–495.
52. Mendelsohn M, Karas R. (1999). The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *N Engl J Med* 340:1801–1811.
53. Miksicsek RJ, Lei Y, Wang Y. (1993). Exon skipping gives rise to alternatively spliced forms

- of the estrogen receptor in breast tumor cells. *Breast Cancer Res Treat.* 26: 163-169.
54. Moenner M, Gusse M, Hatzi E and Badet J. (1994). The widespread expression of angiogenin in different human cells suggests a biological function not only related to angiogenesis. *Eur. J. Biochem.* 226,483-490.
55. Moore F, Riordan JF. (1990). Angiogenin activates phospholipase C and elicits a rapid incorporation of fatty acid into cholesterol esters in vascular smooth muscle cells. *Biochemistry.* 29(1):228-233.
56. Montero S, Guzmán C, Cortés-Funes H, Colomer R. (1998). Angiogenin expression and prognosis in primary breast carcinoma. *Clin Cancer Res.* 4:2161-2168.
57. Montero S, Lloveras B, Cortés-Funes H, Colomer R. (1999). Letters to the editor. *Clin Cancer Res.* 5:3722-3723.
58. NCI: National Cancer Institute; NIH: National Institute of Health. 2005. Cancer Fact Sheets. <http://cancernet.nci.nih.gov/>
59. Nicholson RI, Gotting KE, Gee J, Walker KJ. (1988). Actions of oestrogens and antioestrogens on rat mammary gland development: relevance to breast cancer prevention. *J Steroid Biochem.* 30(1-6):95-103.
60. PAHO: PanAmerican Health Organization. (1999). Breast cancer in the Americas: Raising Awareness. A Report of the Division of Disease Prevention and Control. Program of Non-Communicable Diseases. PAHO, Washington, D.C.
61. Papageorgiou AC, Shapiro R, Acharya KR. (1997). Molecular recognition of human angiogenin by placental ribonuclease inhibitor--an X-ray crystallographic study at 2.0 Å resolution. *EMBO J.* 16(17):5162-5177.
62. Pasqualini RJ. (2004). The selective estrogen enzyme modulators in breast cancer: a review. *Biochim Biophys Acta.* 1654:123– 143.
63. Paweletz CP, Charboneau L, Liotta LA. (2001). Overview of metastasis assays. *Curr Protoc Cell Biol.* 19:19.1
64. Pietras RJ. (2003). Interactions between estrogen and growth factor receptors in human breast cancers and the tumor-associated vasculature. *Breast J.* 9(5):361-373.
65. Pike MC, Spicer DV. (1991). Endogenous estrogen and progesterone as the major determinants of breast cancer risk: Prospects for control by "natural" and "technological" means. *Hormonal Carcinogenesis* (JJ Li, S Nandi and SA Li, Eds.) Springer-Verlag, New

- York, Berlin, Heidelberg, pp 209-216.
66. Rajkulmar T, Gullick J. (1994). The type 1 growth factor receptors in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 29: 3-9.
 67. Rayson D, Vantyghem SA, Chambers AF. (1999). Angiogenesis as a Target for Breast Cancer Therapy. *J Mammary Gland Biol and Neoplasia.* 4(4):415-423.
 68. Richard DE, Berra E, Pouysse´gur J. (1999). Angiogenesis: How a Tumor Adapts to Hypoxia. *Biochem Biophys Res Commun.* 266, 718-722.
 69. Ruvalcaba PE, Mena MR, González NL, Jiménez J, Lara CC, Königsberg FM, Salazar E L, Damián Matsumura P. (2006). "Correlación entre la expresión de los ARNm de angiogenina con las isoformas de los receptores de estrógenos in vitro e in vivo". Presentado en el XXVI Congreso Nacional de Bioquímica, Guanajuato. México. MA170
 70. Russo N, Nobile V, Di Donato A, Riordan J, Valle B. (1996). The C-terminal region of human angiogenin has a dual role in enzymatic activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93,3243-3247.
 71. Russo IH, Russo J. (1998). Role of hormones in mammary cancer initiation and progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 3(1):49-61.
 72. Safe SH. (1995). Environmental and dietary estrogens and human health: is a problem? *Environ Health Persp.* 103: 346-351.
 73. Shapiro R, Riordan JF, Vallee BL. (1986). Characteristic ribonucleolytic activity of human angiogenin. *Biochemistry.* 25(12):3527-32.
 74. Smith K, Fox SB, Whitehouse R, Taylor M, Greenall M, Clarke J, Harris AL. (1999). Upregulation of basic fibroblast growth factor in breast carcinoma and its relationship to vascular density, oestrogen receptor, epidermal growth factor receptor and survival. *Ann Oncol.* 10:707-713.
 75. Soncin F. (1992). Angiogenin supports endothelial and fibroblast cell adhesion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89,2232-2236.
 76. Soares R, Guo S, Gartner F, Schmitt FC, Russo J. (2004). 17 beta -estradiol-mediated vessel assembly and stabilization in tumor angiogenesis requires TGF beta and EGFR crosstalk. *Angiogenesis.* 6(4):271-281.
 77. St. Clair DK, Rybak SM, Riordan JF, Vallee BL. (1987). Angiogenin abolishes cell-free protein synthesis by specific ribonucleolytic inactivation of ribosomes. *Proc Natl. Acad.*

- Sci. USA. 84,8330-8334.
78. St. Clair DK, Rybak SM, Riordan JF, Vallee BL. (1988). Angiogenin abolishes cell-free protein synthesis by specific ribonucleolytic inactivation of 40S ribosomes. *Biochemistry*. 27(19):7263-7268.
79. Sternlicht MD. (2005). The cues that regulate ductal branching morphogenesis. *Breast Cancer Res*. 2006, 8(1):201.
80. StüpieÄ HM, Kolomecki K, Pasieka Z, Komoroswski J, StüpieÄ T, Kuzdak K. (2002). Angiogenesis of endocrine gland tumours new molecular targets in diagnostics and therapy. *Eur J Endocrinol*. 146:143-151.
81. Suzuki T, Miki Y, Nakamura Y, Moriya T, Ito K, Ohuchi N and Sasano H. (2005). Sex steroid-producing enzymes in human breast cancer. *Endocr Relat Cancer*. 12, 701-720.
82. Szyf M, Pakneshan P, Rabbani S. (2004). DNA methylation and breast cancer. *Biochem Pharmacol*. 68:1187-1197.
83. Thomas DB. (1984). Do hormones cause cancer?. *Cancer*. 53: 595-604.
84. Tschesche H, Kopp C, Horl WH, Hempelmann U. (1994) Inhibition of degranulation of polymorphonuclear leukocytes by angiogenin and its tryptic fragment. *J Biol Chem*. 269(48):30274-30280.
85. Valdés V, Pérez A. (1994). Fisiología de la glándula mamaria. En: *Lactancia para la Madre y el Niño*, Santiago Mediterraneo, (ed) 1994, p 21.
86. Vallee BL, Riordan JF. (1997). Organogenesis and angiogenin. *Cell Mol Life Sci*. 53(10):803-15.
87. Vihko R, Apter D. (1989). Endogenous steroids in the pathophysiology of breast cancer. *CRC Crit Rev Oncol Hematol*. 9: 1-16.
88. Vogl G, Dítese O, Kronberger H. (2005). Angiogenic potencial of ductal carcinoma in situ (DCIS) of human breast. *Histopathology*. 47:617-624.
89. WHO. World Health Organization. (1998). *The World Health Report*; WHO Publications. Geneva, Switzerland. www.who.int
90. Wiedlocha Antoni. (1999). Following angiogenin during angiogenesis: a Journey from the Cell Surface to the Nucleolus. *Arch Immunol Ther Exp*. 47,299-305.
91. Yen S, Jaffe R, Barbieri R. (2001). *Endocrinología de la reproducción. Fisiología, fisiopatología y manejo clínico*. 4ª edición. Panamericana. México. 302-318.


92. Zhao H, Grossman HB, Delclos GL, Hwang LY, Troisi CL, Chamberlain RM, Chenoweth MA, Zhang H, Spitz MR, Wu X. (2005). Increased plasma levels of angiogenin and the risk of bladder carcinoma: from initiation ot recurrence. *Cancer*. 104(1):30-5.

X.1. REFERENCIAS DE IMÁGENES.


93. http://www.cancervic.org.au/about-cancer/what_is_cancer.gif
94. <http://www.cepvi.com/medicina/articulos/cancer.shtml>
95. <http://www.dhmc.org>; <http://www.emol.com/>; Darmuth-Hitchcok Medical Center especiales/infografias/enfermedades ginecologicas/cancerdemama.gif
96. <http://www.emol.com/especiales/infografias/enfermedadesginecologicas/cancerdemama.gif>.
97. <http://www.seom.org/seomcms/images/stories/imagenes/socios yprofs/documentación/baseoncologia/2006/foto03.gif>
98. http://www.valley-homecare.com/resource/images/breast_credit.jpg
99. <http://www.youngwomenshealth.org/Images/breasts5.gif>

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: **"REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LA ANGIOGENINA EN EL CÁNCER MAMARIO"**, con fecha _____ de _____ del 2008.

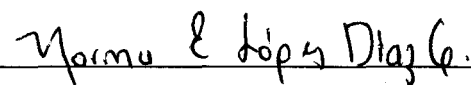
JURADO DE EXAMEN




Presidenta
DRA. MINERVA MUÑOZ GUTIÉRREZ
Departamento de Biología de la Reproducción
División de Ciencias Biológicas y de la Salud. UAM-I.



Vocal
DRA. EDITH LUCIA SALAZAR ESQUIVEL
Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Endocrinas
Hospital de Especialidades. Centro Medico Nacional. Siglo XXI. IMSS.



Vocal
DRA. NORMA EDITH LÓPEZ DÍAZ GUERRERO
Departamento de Ciencias de Salud
División de Ciencias Biológicas y de la Salud. UAM-I.



Secretaria
DRA. MIMA KÖNIGSBERG FAINSTEIN
Departamento de Ciencias de Salud
División de Ciencias Biológicas y de la Salud. UAM-I.