

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA



DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
POSGRADO EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**EFFECTO DE LOS ANDROSTANDIOLES SOBRE LA PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS DE
CÁNCER DE MAMA HUMANO**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

P R E S E N T A

BIOL. EXP. BERTHA ALICIA BARAJAS GÓMEZ

COMITÉ TUTORAL

DIRECTOR

DR. PABLO GUSTAVO DAMIÁN MATSUMURA

ASESORAS

DRA. REBECA LÓPEZ MARURE

DRA. NORMA EDITH LÓPEZ DÍAZ-GUERRERO

MÉXICO D. F., SEPTIEMBRE DEL 2010

Esta tesis se realizó en el laboratorio de Endocrinología Molecular del Departamento de Biología de la Reproducción y laboratorio de Bioenergética y Envejecimiento Celular del Departamento de Ciencias de la Salud, de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, bajo la dirección del **Dr. Pablo G. Damián Matsumura** y con la asesoría de la **Dra. Rebeca López Marure**, del Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez" y de la **Dra. Norma Edith López Díaz-Guerrero** de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.

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

La alumna Bertha Alicia Barajas Gómez fue apoyado con la beca otorgada por parte de CONACyT con el No. de registro 204656.

Parte de este trabajo fue realizado en el Laboratorio Divisional de Biología Molecular de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.

COMITÉ TUTORAL

DIRECTOR

Dr. Pablo Gustavo Damián Matsumura

Departamento de Biología de la Reproducción
Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.
pgdm@xanum.uam.mx

ASESORAS

Dra. Rebeca López Marure

Departamento de Biología Celular del
Instituto Nacional de Cardiología, Ignacio Chávez.
rlmarure@yahoo.com.mx

Dra. Norma Edith López Díaz-Guerrero

Departamento de Ciencias Biológicas
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.
norm@xanum.uam.mx

Los miembros del jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, abajo firmantes, aprobaron la tesis titulada: **“Efecto de los Androstandioles sobre la proliferación de células de cáncer de mama humano”**. El examen de grado de Maestría se realizó el día 09 del mes de Septiembre del año 2010.

JURADO DE EXAMEN

PRESIDENTE

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

SECRETARIO

Dra. Rebeca López Marure
Departamento de Biología Celular del
Instituto Nacional de Cardiología, Ignacio Chávez.
rlmarure@yahoo.com.mx

VOCAL

Dr. Armando Luna López
Departamento de Investigación Básica
Instituto de Geriátria
allbioexp@yahoo.com

VOCAL

M. en BE. Leticia González Núñez
Departamento de Biología de la Reproducción
Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa
gnleti@yahoo.es

AGRADECIMIENTOS

Con admiración, respeto y mucho amor a mis padres, Leonor y José, por haber fomentado en mí el deseo de superación. Gracias por su apoyo, su paciencia, sus consejos y por todo su amor, siempre sin esperar nada a cambio. Este logro es también de ustedes.

Con amor, respeto y admiración a mis abuelos, Guadalupe, Magdalena, María Luisa y Francisco. Gracias por sus valiosas enseñanzas de la vida.

A mis hermanos, Mónica, Francisco Javier y Juan José, por compartir su vida conmigo. Les agradezco por ayudarme a ser una mejor persona cada día y por estar presentes en cada momento. Gracias por sus abrazos y todas las palabras que entiendes solo cuando las escuchas de un hermano.

A Heidel, Alejandra y Gustavo, por su cariño, su paciencia y su complicidad. Gracias por estar en los tiempos difíciles y siempre.

A mi sobrina; Dulce Jimena por haberme enseñado que la vida es realmente un milagro. Gracias por ser mi esperanza y mi alegría.

A mi esposo; Adolfo, compañero siempre en las buenas, las malas y las peores. Gracias por tu paciencia, tu ímpetu, tu alegría, tu fortaleza, y tu amor incondicional.

A mis compañeros de generación de la Maestría en Biología Experimental: Lluvia de Abril, Karina, Lupita, Noé y Jorge, por ser verdaderos compañeros y amigos. Gracias por su tiempo y sus consejos en el salón de clases y fuera de ellos.

A mis compañeros del laboratorio y amigos, Leticia, Erika, Roxana, Carlos, Javier y Alejandro. Gracias por su solidaridad con los experimentos, pero sobretodo por hacer más llevadero el tiempo que pasamos en el laboratorio; nuestra segunda casa.

A mis compañeros y amigos, Armando, Adriana, Viri, Paco y Cristobal, por haberme considerado una compañera desde el primer día que estuve en su laboratorio. Gracias por compartir conmigo su conocimiento y experiencia que fueron de grandiosa ayuda para la realización de este trabajo. Gracias por su cariño, por sus consejos y por haberme apoyado siempre.

A mi director de tesis, Dr. Pablo Damián Matsumura, por sus consejos y observaciones que han sido de valiosa ayuda en el desarrollo del presente trabajo. Gracias por su paciencia y por compartir sus conocimientos y su tiempo.

A mis asesoras, Dra. Norma E. López y Dra. Rebeca López, por el gran apoyo proporcionado durante el trabajo de investigación. Gracias por sus enseñanzas y por sus consejos.

A la Dra. Mina Königsberg por haberme permitido desarrollar parte de este trabajo en su laboratorio y por sus importantes comentarios y valiosos consejos.

A amigos que me han animado para seguir adelante aún en los momentos más adversos, gracias Sinhúe, Gabriela, Edgar, Ricardo, Julio, Rodolfo, Liliana y Ángel.

Gracias a todos aquellos que han participado para que este propósito pudiera ser una realidad.

ÍNDICE	Página
Resumen	1
Abstract	2
1. Introducción	3
1.1 Definición de cáncer	3
1.2 Defunciones por tumores malignos	3
1.3 Cáncer de mama	4
1.3.1 Factores geográficos y ambientales	4
1.3.2 La Edad	5
1.3.3 Antecedentes genéticos y familiares	5
1.3.4 La exposición prolongada a estrógenos endógenos	5
1.3.5 Exposición prolongada a estrógenos exógenos	5
1.3.6 Los anticonceptivos orales	5
2. Antecedentes	8
2.1 El ciclo celular en las células cancerosas	9
2.2 Efecto del estradiol sobre el ciclo celular	11
2.3 Efecto de los andrógenos en el cáncer de mama	12
2.4 Androstandioles: Metabolitos de la testosterona a partir de DHT	13
3. Justificación	16
4. Hipótesis	17
4.1 Objetivo general	17
4.2 Objetivos específicos	17
5. Material y Métodos	18
5.1 Material Biológico	18
5.2 Esteroides	18
5.3 Cultivo de las células de la línea MCF-7	18
5.4 Estudios de proliferación celular por el Método de Incorporación de la Timidina- [3H]	19
5.5 Prueba por exclusión de azul tripano para verificar la viabilidad de las células tratadas	20
5.6 Aislamiento del ARNm (RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, USA)	20
5.6.1 Análisis de los ARN en electroforesis en geles de agarosa en condiciones desnaturalizantes	21
5.7 Análisis de la expresión de los genes a través de sus ARNm	21
5.8 Obtención de las proteínas totales y determinación de los niveles de Ciclina D1	23

5.8.1 Determinación del contenido de proteína	24
5.8.2 Determinación de los niveles de proteína de la Ciclina D1 por Western Blot	24
5.9 Análisis estadístico	25
6. Resultados	26
6.1 Efecto de los Androstandioles sobre la proliferación de las células MCF-7	26
6.2 Efecto de los Androstandioles sobre la expresión de la Ciclina D1 en células MCF-7	28
6.3 Participación de los Receptores de Estrógenos en la inducción de la expresión de la ciclina D1 por los Androstandioles en células MCF-7	31
7. Discusión y Conclusión	33
8. Perspectivas	37
9. Bibliografía	38

ABREVIATURAS

3 -Adiol	5 -androstano-3 ,17 -diol
3 -Adiol	5 -androstano-3 ,17 -diol
3 -HED	3 -Hidroiesteroide deshidrogenasa
3 -HED	3 -Hidroiesteroide deshidrogenasa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
Androstandioles	3 -Adiol y 3 -Adiol
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
CAK	Cinasas activadoras de Cdk
Cdk	Cinasas dependientes de ciclinas
Cdkl	Inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas
DHT	5 -Dihidrotestosterona
DMEM	Medio Eagle modificado por Dubelcco
dNTP's	desoxinucleótidos trifosfato (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
E ₂	Estradiol
EDTA	Ácido etilén diamino tetra acético
ERA	Elemento que responde a andrógenos
ERE	Elemento que responde a estrógenos
FMF	Solución desnaturalizante para ARN
GF	Factor de crecimiento
H ₂ O-DEPC	H ₂ O tratada con dietilpirocarbonato
MOPS	Ácido 3-[N-Morfolino] propanosulfónico
P ₄	Progesterona
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
RA	Receptor de andrógenos; androgen receptor
RE	Receptores de estrógenos; estrogen receptor
RE	Receptor de estrógenos alfa
RE	Receptor de estrógenos beta
RP	Receptor de progesterona
RT	Retrotranscripción
SBF	Suero de feto bovino
SBF-C	SFB previamente inactivado por calor y libre esteroides endógenos
T	Testosterona
TBE	Solución amortiguadora para ADN
TGF	Factor de crecimiento de trofoblastos

RESUMEN

El cáncer de mama (CaM) es la primera causa de muerte oncológica en México en mujeres mayores de 25 años. En esta neoplasia maligna el papel de los estrógenos en el desarrollo y la progresión del CaM está bien documentado, no así el de los andrógenos, cuya participación sigue siendo controversial. Recientemente reportamos que la línea celular de carcinoma mamario MCF-7 puede biotransformar a la testosterona en los metabolitos 3 β ,5 α -androstadiol (3 β -Adiol) y 3 α ,5 α -androstadiol (3 α -Adiol), los cuales tienen la capacidad de unirse a ambos receptores de estrógenos, ejercen efectos de tipo estrogénico e inducen la proliferación celular. El objetivo del presente trabajo fue determinar si los androstadioles son capaces de inducir cambios en la proliferación celular y en la expresión de la ciclina D1, la cual es una proteína regulada por estrógenos y controla la transición de la fase G1 a S del ciclo celular.

Las células MCF-7 se cultivaron en DMEM, libre de rojo fenol y adicionado con suero de bovino fetal al 2.5%, libre de esteroides. Las células se sincronizaron por privación de suero durante 48 horas y posteriormente se iniciaron los tratamientos. Utilizando la técnica de incorporación de ^3H -timidina y azul tripano. La expresión de la proteína de la ciclina D1 se midió por Western blot después de 1, 3, 6, 12 y 21.5 horas, mientras que la expresión del ARNm que codifica a la ciclina D1 se midió por medio de RT-PCR semicuantitativo a las mismas horas de incubación.

Los resultados del efecto de los androstadioles sobre la proliferación de las células MCF-7 en función del tiempo demostraron que ambos androstadioles fueron capaces de inducir la proliferación celular, con un efecto máximo (2.1 veces vs control) después de 48 horas de incubación, de forma similar a la que ejerce el estradiol (E_2 ; 1×10^{-9} M), pero con mayor concentración del 3 β -Adiol (10^{-6} M) y del 3 α -Adiol (10^{-7} M). Cuando se analizó el efecto de los androstadioles sobre la expresión de la proteína de la ciclina D1 y su ARNm en las células MCF-7 se observó que los niveles del ARNm y la proteína de la ciclina D1 incrementaron significativamente comparados con el control, después del tratamiento con 3 β -Adiol (10^{-6} M) o 3 α -Adiol (10^{-7} M), en forma semejante al estradiol (E_2 ; 10^{-9} M) pero en diferentes periodos de tiempo. El incremento en los niveles de la ciclina D1 inducido con 3 β -Adiol se retrasa 3 h y con 3 α -Adiol el retraso es de 9 h con respecto al inducido por estradiol.

Se observó correlación entre los cambios en el nivel de expresión del ARNm y la proteína de la ciclina D1. En conclusión podemos decir que en ausencia de estradiol, los androstadioles pueden estimular la proliferación celular e inducir la expresión de genes que están regulados por estrógenos, en este modelo de estudio. Consideramos que estos resultados deben tomarse en cuenta cuando se utilicen terapias antineoplásicas basadas en inhibidores de la aromatasa.

ABSTRACT

Breast cancer is the leading cause of oncological death in Mexican women over 25 years old. In this malignancy, the role of estrogens in the development and progression of breast cancer is well documented, however participation of androgens remains controversial. Recently we reported that the breast carcinoma cell line MCF-7 can biotransform testosterone metabolites into 3 β ,5 α -androstane-2 α -diol (3 β -Adiol) and 3 β ,5 α -androstane-2 β -diol (3 β -Adiol), which have the ability to bind both estrogen receptors (alpha and beta), exert estrogen-like effects and induce cell proliferation. The aim of this study was to determine whether androstane-diols were able to induce cell proliferation and changes in cyclin D1 expression, which is an estrogen-regulated protein that controls the transition from G1 to S phase cell cycle.

MCF-7 cells were cultured in DMEM media without phenol red and supplemented with 2.5% fetal calf serum/charcoal stripped. MCF-7 cells were synchronized by serum deprivation for 48 hours and then incubated with each androstane-diols or estradiol as positive control. Cell proliferation was measured by the ³H-thymidine incorporation and trypan blue techniques. Cyclin D1 protein expression was measured by Western blot after 1, 3, 6, 12 and 21.5 hours of incubation, while the expression of its mRNA was measured by semi-quantitative RT-PCR at the same times of incubation.

The results show that both androstane-diols are able to induce MCF-7 proliferation, with a maximal effect after 48 hours incubation (>2X vs. control) but higher concentrations of 3 β -Adiol (10⁻⁶ M) and 3 β -Adiol (10⁻⁷ M) were needed to exerted cell proliferation induced by estradiol (10⁻⁹ M). When we examined the effects of androstane-diols on the expression of cyclin D1 protein and mRNA in MCF-7 cells, we observed that cyclin D1 mRNA and protein levels increased significantly, compared to vehicle-treated cells, after treatment with 3 β -Adiol (10⁻⁶ M) or 3 β -Adiol (10⁻⁷ M), nonetheless longer periods of times were needed to reach those levels obtained after estradiol treatment (10⁻⁹ M), since cyclin D1 increase were delayed 3 or 9 hours when MCF-7 cells were stimulated with 3 β -Adiol or 3 β -Adiol respectively. Correlation between cyclin D1 mRNA and protein levels of expression was observed.

In this report we confirm that androstane-diols can stimulate human breast cancer MCF-7 cell proliferation grown under estrogen-free conditions, and for the first time that demonstrate both androstane-diols are able to induce the expression of Cyclin D1, a key protein that controls cell cycle progression. These results should be taken into account when using anti-hormone therapies against breast cancer based on aromatase inhibitors, since androstane-diols concentrations may have proliferative estrogenic-like activity under certain conditions.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Definición de Cáncer

Las neoplasias, etimológicamente "crecimientos nuevos", son masas anormales de tejido cuyo crecimiento es excesivo y desordenado respecto del normal; este crecimiento continua aún después de que se interrumpe el estímulo que indujo el cambio. Las células neoplásicas a pesar de tener mutaciones, continúan replicándose e ignoran las influencias reguladoras que controlan el crecimiento de las células. El nombre genérico de las neoplasias o tumores malignos es *cáncer*, derivada de la palabra latina asignada al cangrejo -ya que se adhieren a cualquier parte donde se asientan-. "Maligno" según se aplica a una neoplasia implica que la lesión puede invadir y destruir estructuras adyacentes, propagarse a sitios distantes (metástasis) y causar la muerte (Kumar *et al.*, 2001; Pagani *et al.*, 2010).

1.2 Defunciones por tumores malignos

De acuerdo con de la Organización Mundial de la Salud (OMS) el cáncer es la primera causa de mortalidad a nivel mundial; se le atribuyen 7.4 millones de defunciones ocurridas en 2007, lo que representan aproximadamente 13% del total. Estas defunciones se debieron principalmente al cáncer de pulmón (primer lugar de mortalidad entre los hombres), de estómago, de hígado, de colon y de mama (primer lugar de mortalidad entre las mujeres). De acuerdo con las estimaciones de la OMS, se calcula que para el año 2030 las muertes debidas a alguna neoplasia seguirán en aumento y alcanzaran 12 millones de casos en todo el mundo (OMS, 2010).

En los últimos diez años, las mujeres han presentado mayores porcentajes de muerte por neoplasias, en comparación con los hombres, debido principalmente a las diferencias biológicas y al grado de exposición a factores de riesgo, lo que hace que algunos tipos de cáncer se desarrollen de forma diferenciada entre mujeres y hombres, ya que las mujeres mueren más por tumores en el aparato reproductivo (el 31.6% de los decesos por cáncer) que los varones (10.9%) (Knaul *et al.*, 2009).

Las dos primeras causas de defunción por cáncer en mujeres, se deben al cáncer cérvico-uterino y al cáncer de mama, sin embargo han evolucionado de tal forma en el tiempo que estas causas han invertido su presencia. Hasta el año 2005, el cáncer cérvico-uterino representaba la principal causa de muerte en mujeres, pero a partir del año 2006 este lugar lo ocupó el cáncer de mama. Desde 1998 se ha observado disminución constante para el cáncer cérvico-uterino, principalmente debido a que se ha atacado el agente causal principal, el virus del papiloma humano; por el contrario, y aunque con una

velocidad más lenta, el cáncer de mama ha presentado incremento constante en los últimos diez años, ubicándolo en el primer lugar desde el 2006 (INEGI, 2010).

1.3 Cáncer de mama

El cáncer mamario representa un desafío en materia de salud pública en todos los países alrededor del mundo (WHO, 2006). En México, la mortalidad por tumores malignos va en aumento. Con base en las Estadísticas vitales 1998-2008, el cáncer de mama presenta un índice de mortalidad de 13.4% vs 11.2 % del cáncer cérvico-uterino (INEGI, 2010). Un indicador que permite conocer su impacto es la tasa de mortalidad, la cual mide el número de muertes debidas a este tipo de cáncer, en un año, por cada 100 mil mujeres de 25 o más años de edad. En México se estimó que alrededor de 21 mujeres de 25 años y más, de cada 100 mil, murieron por cáncer de mama durante el año 2007 (INEGI, 2010; Porter, 2009).

El notable incremento en la incidencia de cáncer mamario observado en las últimas décadas en mujeres mexicanas se ha asociado a factores reproductivos que incluyen, la menarquía temprana (antes de 12 años), la menopausia tardía (después de 55 años), la nuliparidad, la edad tardía del nacimiento del primer hijo/a (después de los 30 años) e incluso la ausencia de lactancia materna. La asociación entre estos factores y el riesgo de cáncer de mama se debe al tiempo de exposición a las hormonas sexuales (McTiernan *et al.*, 2008). Estos cambios se suman a factores externos como la administración de estrógenos y progestinas sintéticas, utilizadas en formulaciones anticonceptivas y de reemplazo hormonal en el climaterio y la menopausia, así como los xenoestrógenos presentes en alimentos y suplementos alimenticios (Fernandez y Russo, 2010; Darbre y Charles, 2010).

Se han encontrado relaciones particulares entre algunos factores de riesgo, con la etiología del cáncer de mama (Amir *et al.*, 2010). A continuación se presentan estos factores divididos en grupos bien establecidos y se indica donde impone cada uno su riesgo relativo (Cuadro 1).

1.3.1 Factores geográficos y ambientales.- Existen diferencias entre los países respecto a las tasas de incidencia y mortalidad por cáncer mamario. El riesgo para esta forma de neoplasia es mucho más alto en Norteamérica y el norte de Europa que en Asia y África. Al parecer estas diferencias son ambientales y no de origen genético, puesto que quienes emigran de los sitios de baja incidencia a las áreas de alta incidencia tienden a adquirir las tasas de sus países de adopción y viceversa (Kumar *et al.*, 2001).

1.3.2 La Edad.- En general la frecuencia de cáncer de mama aumenta con la edad. La mortalidad por esta causa se observa entre las edades de 55 y 75 años y después declina. La elevación de la incidencia con respecto a la edad puede explicarse debido a la acumulación de mutaciones somáticas relacionadas con el surgimiento de neoplasias malignas. Sin embargo, el cáncer de mama cada vez se presenta con mayor frecuencia entre personas jóvenes (McTiernan *et al.*, 2008).

1.3.3 Antecedentes genéticos y familiares.- El carcinoma mamario presenta una predisposición familiar notable. En este tipo de neoplasia maligna se han identificado influencias genéticas bien definidas. Estas se desarrollan en forma espontánea luego de mutaciones en células somáticas, y por lo tanto se presume que son de origen ambiental en su mayor parte. Alrededor de 5 a 10% de los cánceres de mama se relacionan con mutaciones específicas heredadas (Kumar *et al.*, 2001).

1.3.4 La exposición prolongada a estrógenos endógenos.- Este factor constituye un factor de mayor riesgo sobre todo en los primeros decenios de la vida. Por lo tanto, el inicio temprano de ciclos menstruales, la menopausia tardía, el embarazo tardío, nuliparidad y menor número acumulado de meses de lactancia incrementan el riesgo de cáncer mamario, porque todos estos factores prolongan el tiempo de exposición a las concentraciones máximas de estrógenos del ciclo menstrual (McTiernan *et al.*, 2008).

1.3.5 Exposición prolongada a estrógenos exógenos.- Muchos autores consideran que aumenta el riesgo de cáncer mamario después de la menopausia. No hay un consenso aún acerca de la magnitud del incremento en el riesgo, pero el peso de la evidencia favorece un riesgo relativo de 1.5 a 1.8 luego de más de 5 años de empleo de terapia de reemplazo hormonal, sin evidencia clara de que el uso combinado de estrógenos y progestinas disminuya dicho riesgo (Kumar *et al.*, 2001).

1.3.6 Los anticonceptivos orales.- Estas formulaciones incrementan el riesgo de cáncer mamario. Las fórmulas más recientes de dosis bajas balanceadas de estrógenos combinados con progestinas sólo imponen un riesgo un poco mayor, sobre todo en mujeres nulíparas menores de 25 años de edad (Gaffield *et al.*, 2009).

Muchos otros factores de riesgo están implicados en el cáncer mamario; como la obesidad, el consumo de alcohol, el tabaquismo y la dieta rica en grasas, sin embargo la evidencia es indirecta. (Kumar *et al.*, 2001; Brody, 2010; Khan *et al.*, 2010).

Cuadro 1.- FACTORES DE RIESGO PARA CÁNCER MAMARIO

Factor	Riesgo Relativo
<i>Influencias bien establecidas</i>	
Factores geográficos	Varían en diferentes áreas
Edad	Aumenta después de los 30 años de edad
<i>Historia Familiar</i>	
Consanguíneo de primer grado con cáncer de mama	1.2 – 3.0
Premenopausia	3.1
Premenopausia y bilateral	8.5 – 9.0
Posmenopausia	1.5
Posmenopausia y bilateral	4.0 – 5.4
<i>Historia menstrual</i>	
Edad de la menarquía 12 años	1.3
Edad de la menopausia 55 años	1.5 – 2.0
<i>Embarazo</i>	
Primer nacimiento con feto vivo entre 25 y 29 años	1.5
Primer nacimiento con producto vivo después de los 30 años	1.9
Primer nacimiento con producto vivo después de los 35 años	2.0 – 3.0
Nulípara	3.0
<i>Enfermedad mamaria benigna</i>	
Enfermedad proliferativa	1.9
Enfermedad proliferativa con hiperplasia atípica	4.4
Carcinoma lobulillar <i>in situ</i>	6.9 – 12.0
<i>Influencias menos bien establecidas</i>	
Estrógenos exógenos	
Anticonceptivos orales	
Obesidad	
Dieta rica en grasas	
Consumo de alcohol	
Tabaquismo	
Modificado de Kumar <i>et al.</i> , 2001.	
The women at increased risk of breast cancer: evaluation and management strategies.	

Existen diversas evidencias que indican que las hormonas esteroides sexuales, particularmente los estrógenos y la progesterona (P₄), juegan un papel determinante en la génesis del cáncer de mama (Beleut *et al.*, 2010).

Por tal motivo, y debido a la dependencia hormonal del cáncer de mama, la caracterización inmunohistoquímica de los receptores intracelulares de estrógenos (RE) y de progesterona (RP) ha sido utilizada como marcador de actividad tumoral y de diagnóstico (Ge *et al.*, 2009). Sin embargo, se han descrito isoformas y alteraciones estructurales de estos receptores en mujeres sanas y pacientes con cáncer de mama, lo que hace más difícil su detección al clasificarlos por la presencia o ausencia de los receptores a estas hormonas (Allred *et al.*, 2009).

Ha sido ampliamente demostrado que los estrógenos juegan un papel muy importante en el crecimiento y desarrollo de la glándula mamaria normal, así como en la progresión del cáncer mamario. Esta observación es confirmada por estudios donde la ooforectomía, la administración de agentes con actividad antiestrogénica y de inhibidores de aromatasas (enzimas que biotransforman testosterona en estradiol) pueden revertir el cáncer de mama (Files *et al.*, 2010). Si bien, el efecto de los estrógenos en la génesis y progresión del cáncer mamario ha sido bien establecida, el papel de los andrógenos en esta neoplasia maligna ha sido controversial (Bretters y Mathelin, 2008).

2. ANTECEDENTES

Los andrógenos tienen efectos fisiológicos importantes en las mujeres, sin embargo, también han sido implicados durante el desarrollo del cáncer de mama. La glándula mamaria es capaz de sintetizar tanto estradiol como testosterona. Se ha reportado que las enzimas necesarias para la formación de andrógenos y estrógenos desde sus precursores esteroideos están presentes en tejido normal de la glándula mamaria y en líneas celulares de cáncer de mama (Sasano *et al.*, 2006).

Los andrógenos estimulan o inhiben el crecimiento *in vitro* de las células de cáncer de mama dependiendo de la línea celular y el sistema de análisis que se utilice.

Los andrógenos como la testosterona y la dihidrotestosterona (DHT) se unen al receptor de andrógenos (RA) intracelular y así ejercen su función. El RA es un miembro de la superfamilia de receptores nucleares de hormonas, los cuales se componen clásicamente de un dominio de unión al ADN, un dominio de unión a la hormona y un dominio de activación. La expresión del RA es abundante en el epitelio normal de la glándula mamaria, en la mayoría de los especímenes de cáncer de mama y en las líneas celulares (Zhou *et al.*, 2001). El RA está co-localizado con los receptores de estrógenos y progesterona en las células epiteliales, pero no se ha detectado en el estroma o mioepitelio de la glándula mamaria. La co-expresión del RE y el RA en las células epiteliales de la glándula mamaria sugieren que los efectos de los estrógenos y andrógenos sobre la proliferación del epitelio mamario están integrados (Moinfert *et al.*, 2003).

La capacidad inhibitoria de los andrógenos sobre la progresión de los tumores mamarios fue documentada en estudios clínicos y experimentales (Labrie *et al.*, 2006), aunque también se ha reportado la ausencia de efectos antiproliferativos en líneas celulares de cáncer de mama. Por otro lado, se ha demostrado que los andrógenos pueden exhibir un efecto inhibitorio inicial, que cambia a un efecto final de estimulación sobre la proliferación en las células. Se ha sugerido que los andrógenos como la testosterona y la DHT pueden regular la expresión de proteínas que controlan la progresión del ciclo celular, actuando a través del receptor de andrógenos (Aspinall *et al.*, 2004). En las líneas celulares de cáncer de mama (MCF-7) y de próstata (PC3) se ha observado que dosis bajas (picomolar) de andrógenos incrementan el porcentaje de proliferación celular en la fase S, mientras que dosis fisiológicas altas, resultan en el paro de las células en la fase G0/G1 del ciclo celular (Lamont y Tindall, 2010; Brettes y Mathelin, 2008).

Además, existen estudios que señalan que los andrógenos pueden jugar un papel protector en mujeres premenopáusicas, a través de mecanismos que bloquean la proliferación celular por medio de la activación de inhibidores de cinasas de proteínas, como la proteína p21^{WAF1/CIP1}, cuyo gen es blanco de los receptores de andrógenos unidos a su ligando (Greeve *et al.*, 2004).

Se ha demostrado que la exposición de células MCF-7 a la DHT; un andrógeno natural más potente que la testosterona puede sostener el arresto del ciclo celular o incluso inducir la apoptosis, deteniendo la progresión del ciclo celular en la interfase G1/S al inhibir la expresión de la ciclina D2 en células de Sertoli (Tan *et al.*, 2005).

Los procesos que controlan la proliferación celular se basan en el fino balance que regula los procesos de progresión, paro del ciclo y apoptosis. Este último proceso juega un papel crucial en el mantenimiento de los tejidos normales, evitando que células dañadas o que presentan mutaciones en su ADN puedan seguir proliferando, por lo que su desregulación puede conllevar a formación de células neoplásicas que pueden volverse cancerosas (Schmitt *et al.*, 2007)

Particularmente se ha observado que los andrógenos y estrógenos controlan el número de células en sus respectivos tejidos blanco (células epiteliales en la próstata, en la glándula mamaria, en el endometrio, etc.), a través de tres mecanismos. Estos son 1) por un incremento en la proliferación celular, un fenómeno que ocurre durante la pubertad y después de la administración de éstas hormonas esteroides, en sujetos gonadectomizados, 2) por la inhibición de la muerte celular y 3) por la inhibición de la proliferación celular, un efecto observado después de la administración prolongada de estrógenos en sujetos gonadectomizados (Nadji *et al.*, 2005).

2.1 El ciclo celular en las células cancerosas

En las pasadas dos décadas se realizaron avances significativos en el entendimiento del ciclo celular en células eucariontes. El ciclo celular se divide en fase G₁, fase S (síntesis de ADN), fase G₂ y fase de la mitosis (fase M). Las células cancerosas pierden el control del ciclo celular. El control de la proliferación celular en la glándula normal es dependiente de hormonas esteroides y de su interacción con otras hormonas y factores de crecimiento. La acción de las hormonas resulta en la activación de tres proto-oncogenes (c-Myc, Ciclina D1 y Ciclina E), los cuales determinan la transición de las células, de la fase G₁ a la fase S del ciclo celular (Butt *et al.*, 2008).

El tránsito a través de las fases del ciclo celular depende de la activación secuencial de las enzimas con actividad de cinasa dependientes de ciclinas (Cdk), tres de las cuales; Cdk4/6, Cdk2 y Cdk1, parecen ser las más importantes, en ese orden de activación, para llevar a cabo el ciclo celular.

La activación de Cdk4/6 por estímulos de crecimiento (factor de crecimiento y los estrógenos) determinan la salida de la fase G₀ y la entrada a la fase G₁, en tanto que la activación de Cdk2 ocurre a la mitad de la fase G₁ y regula la transición y el paso a través de la fase S, mientras que la fase G₂ y la fase de la mitosis es determinado por la Cdk1. Por otro lado, la activación de las Cdk requiere de la unión a proteínas reguladoras específicas, que son las ciclinas, y de la fosforilación de importantes residuos de aminoácidos en las Cdk (Sherr y Roberts, 2004).

Las células normales del epitelio mamario no progresan de una fase a la siguiente a menos de que el proceso de fases se complete correctamente. Estos chequeos en la progresión son denominados "checkpoints" o puntos de revisión del ciclo celular. Estos puntos de revisión dependen del estado de activación de las Cdk (Shapiro, 2006), o de la presencia de inhibidores de las mismas (CdkI del idioma inglés; cyclin dependent kinases inhibitors). Estas proteínas se agrupan en dos familias e inhiben la actividad de las Cdk. Los genes de la familia INK4, que codifican para las proteínas p16^{INK4A}, p15^{INK4B}, p18^{INK4} y p19^{INK4}, fueron primeramente identificados como genes supresores de tumores. La proteína p16^{INK4A} el prototipo de esta familia, forma dímeros con Cdk4 y Cdk6 e inhibe la activación de las cinasas y evita la formación de complejos con miembros de la familia de la ciclina D (Shapiro, 2006). Se ha demostrado que los estrógenos pueden activar indirectamente la síntesis de la ciclina D1 (Doisneau-Sixou *et al.*, 2003).

La segunda familia de inhibidores de las Cdk es la familia CIP/KIP, la cual está constituida por las proteínas p21^{CIP1}, p27^{KIP1} y p57^{KIP2}. Estas proteínas forman complejos triméricos con Cdk2 unida a la ciclina E o ciclina A e inactivan la actividad enzimática. La interacción de estas proteínas con Cdk4/6 es más compleja, debido a que las concentraciones fisiológicas de p21^{CIP1} y p27^{KIP1} promueven la formación de complejos activos Cdk4/6-Ciclina D, pero su sobre-expresión inhibe la actividad de Cdk4/6 (Matsuura *et al.*, 2004). Una de las funciones del complejo Cdk4-Ciclina D es secuestrar a los inhibidores p27^{KIP1}/ p21^{CIP1}, permitiendo que los complejos Cdk2-Ciclina E y Cdk2-Ciclina A faciliten su activación y la progresión del ciclo.

La actividad de las Cdk también es controlada por las cinasas activadoras de Cdk (CAK por sus siglas en inglés; Cdk activating kinases), las cuales fosforilan los residuos de tirosina en la posición 180 (Y180) en las Cdk1. Adicionalmente, la actividad de Cdk1 y Cdk2 es restringida por la inhibición de la fosforilación en los residuos Y15 y T14, siendo fosfatasas específicas de la familia CDC25, las que defosforilan estos residuos, permitiendo la activación de las Cdk. Esta familia tiene tres miembros;

Cdc25A la cual se activa predominantemente en la fase G₁, Cdc25B en la fase S y Cdc25C en la transición G₂/M (Sherr y Roberts, 2004).

Otro mecanismo con respecto a la desregulación del crecimiento y la etiología del cáncer, se asocia con la pérdida de la función de la proteína p53, producto proteico de un gen supresor de tumores y con la desregulación de la vía pRb (producto del gen del retinoblastoma), en casi todos los tumores humanos. La forma activa es la hiperfosforilada. En esta fase de fosforilación se encuentra unida a E2F. Cuando Rb se fosforila por las Cdk libera al factor E2F que dispara las señales de la proliferación. Se cree que los miembros de la familia E2F (E2F-1, 2, 3 y 4) inducen importantes genes que se requieren para entrar a la fase S, incluyendo las ciclinas A y E (Seville *et al.*, 2005). En una gran proporción de tumores, tanto p16^{INK4A} es disfuncional o Rb está mutado, resultando en la pérdida en la síntesis de la proteína y una consecuente falla para secuestrar al factor de transcripción E2F (Bosco y Knudsen, 2007). En casi 50% de los tumores, el gen que codifica para la proteína p53 está mutado, por lo tanto es incapaz de inducir la transcripción de p21^{CIP1}, lo cual conlleva a una inapropiada activación de la Cdk2 y a un tránsito anormal a través de la fase G₁, así como también p53 también puede inducir la apoptosis en células anormales o con daño en el ADN. La pérdida de función en estas dos vías favorece la división de células anormales y la malignidad. En algunas células tumorales de la glándula mamaria se ha demostrado la pérdida de función en estas dos vías (Millau *et al.*, 2010).

2.2 Efecto del estradiol sobre el ciclo celular

En las pasadas tres décadas, se ha estudiado el efecto del E₂, así como sustancias con actividad antiestrogénica (tamoxifen y antiestrógenos esteroidales [ICI 182, 780]), en cultivos celulares de cáncer de mama (Doisneau-Sixou *et al.*, 2003). El desarrollo de condiciones de cultivo de células libres de suero (el cual puede tener moléculas con actividad estrogénica) fue requerido para demostrar que el E₂ induce la transición de la fase G₁ a la fase S, en células de cáncer de mama (Seetharaman *et al.*, 2004).

Existen evidencias que señalan que en las células de cáncer de mama se sobre-expresa la ciclina D1 (tanto ARNm como la proteína) en 50%, comparada con las células ductales normales (Shu *et al.*, 2005; Yu *et al.*, 2008, Aaltonen *et al.*, 2008). De acuerdo con estos resultados, la ciclina D1 es un blanco bien definido de la acción del E₂ en las células MCF-7, así como en el tejido normal y neoplásico de mama, ovario y endometrio uterino (Shiozawa *et al.*, 2004). En las células MCF-7, la incubación con E₂ induce la entrada de las células a la fase G₁ del ciclo celular.

El E₂ también aumenta la síntesis del ARNm de la ciclina D1 después de 1 y 3 horas de incubación y posteriormente aumenta la proteína de 2 a 3 veces, a las 3 y 6 horas del tratamiento (Seetharaman *et al.*, 2004; Tashiro *et al.*, 2007).

Altucci y colaboradores demostraron que el E₂ puede activar directamente la ciclina D1, ya que el promotor que controla la expresión génica de esta proteína tiene un elemento que responde a estrógenos (ERE).

A pesar de las múltiples evidencias señaladas anteriormente sobre el papel de los estrógenos en la regulación del ciclo celular de células normales y cancerosas, el papel de los andrógenos en el cáncer de mama no ha sido estudiado, en particular sobre la inducción de la síntesis de activadores o represores de la proliferación celular (Yuan *et al.*, 2006)

2.3 Efecto de los andrógenos en el cáncer de mama

Los andrógenos son muy importantes en los efectos fisiológicos en las mujeres, sin embargo también han sido implicados en el cáncer de mama.

Labrie y colaboradores (2000), al igual que Sasano y colaboradores (2006) sugieren que la mayor proporción de los andrógenos efectores en las mujeres derivan como una acción endocrina. Mientras que los niveles de testosterona y DHT circulantes son cinco a diez veces mayores en hombres que en mujeres, la abundancia de metabolitos de andrógenos es dos veces menor en hombres, lo cual sugiere que la producción local y la acción de los andrógenos y sus metabolitos en las mujeres puede ser más significativa que lo sospechado históricamente.

El balance entre los efectos de los estrógenos y los andrógenos es un factor crítico que regula la proliferación celular, tanto en la glándula mamaria normal como en tejido canceroso (Labrie, 2006). Sin embargo, todavía no es posible identificar la proporción predictiva específica entre los estrógenos/andrógenos sobre el desarrollo y la progresión del cáncer mamario.

Los andrógenos ejercen efectos anti-proliferativos predominantemente, mediante la activación de la vía del RA, en células de carcinoma mamario humano. Sin embargo existen reportes que difieren de los resultados presentados por estos autores. El RA se expresa en la mayoría de los tejidos de carcinoma de mama humano, sugiriendo que los andrógenos tiene un papel importante durante el desarrollo y la progresión de estos carcinomas (Lin *et al.*, 2009).

La concentración de los andrógenos ha sido examinada previamente, en tejidos de cáncer de mama, por dos grupos de investigadores (Page *et al.*, 2004; Eliassen *et al.*, 2006; Adly *et al.*, 2006) y han demostrado que el andrógeno más potente, DHT, está presente en niveles altos en tejidos de carcinoma de mama, así como en plasma.

2.4 Androstandioles: Metabolitos de la testosterona a partir de DHT

La DHT puede aún reducirse en el anillo A de la molécula por la acción de dos enzimas específicas localizadas en ciertos órganos blanco, como se ilustra en la figura 1, a partir de DHT es posible sintetizar dos moléculas denominadas androstandioles, los cuales desempeñan un papel fundamental en la expresión biológica de los andrógenos. El 3, 5 -androstandiol (3 -Adiol), un derivado tetrahidrorreducido de la testosterona, el cual se forma a partir de DHT por acción de la 3 -hidroxiesteroide deshidrogenasa en una acción completamente reversible. El compuesto resultante, cuando es administrado en forma sistémica, muestra potente actividad androgénica (crecimiento de órganos sexuales anexos) a pesar de su falta de interacción con el receptor intracelular de andrógenos. Esta aparente paradoja se explica por su continua interconversión a DHT, un mecanismo que asegura a la DHT un mayor tiempo de residencia intracelular en los órganos blanco (Labrie *et al.*, 2005).

Otro compuesto que se forma a partir de DHT es el 3, 5 -androstandiol (3 -Adiol). La conversión de DHT al 3 -Adiol es mediada por la acción de la 3 -hidroxiesteroide deshidrogenasa, no es un proceso totalmente reversible, ya que la dirección predominante de esta reacción es hacia 3 -Adiol. En fecha reciente se ha sugerido que este compuesto no fenólico y que no puede transformarse biológicamente en un estrógeno, interactúa de manera específica con el sitio activo del receptor intracelular de estrógenos; como resultado de esta unión de alta afinidad con el receptor de estrógenos, el 3, 5 -androstandiol no puede iniciar procesos bioquímicos intracelulares reconocidos clásicamente como dependientes de estrógenos. Estas nuevas observaciones subrayan la importancia del metabolismo periférico de los andrógenos en sus mecanismos de acción (Penning y Byrns, 2009).

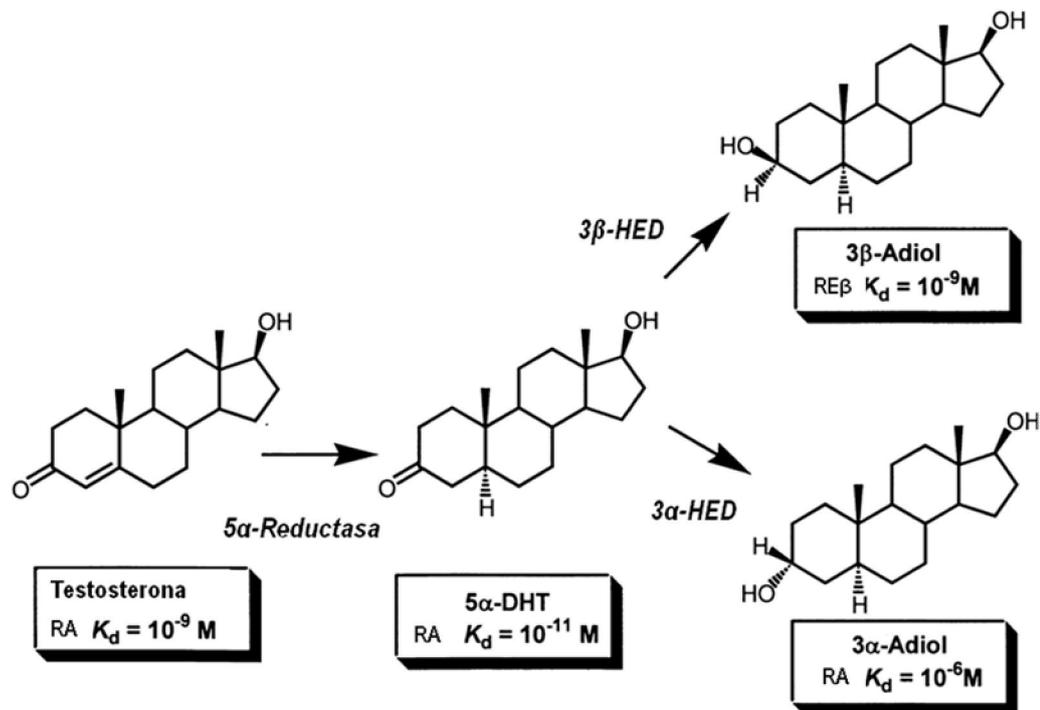


Figura 1.- Biotransformación de la testosterona a sus metabolitos tetrahidrorreducidos. La formación de los androstandioles requiere primero de la reducción del doble enlace del anillo A de la molécula de T formando a la DHT, un paso que es mediado por 5α -Reductasa. Posteriormente, por la acción de las enzimas específicas: 3β -HED y 3α -HED, se reduce el grupo cetona del carbono 3 formando un grupo hidroxilo orientándolo en diferente posición ya sea en posición alfa o beta, generando el 3β -Adiol y 3α -Adiol, respectivamente.

Se ha estudiado el papel de los andrógenos sobre la proliferación de las células de cáncer de mama. Recientemente demostramos que las células MCF-7 exhiben muy alta actividad enzimática. Estas células pueden transformar a la testosterona en metabolitos no fenólicos, 5α -reducidos, como la DHT y los androstandioles, el 3α -Adiol, y el 3β -Adiol. Después de 24 h de incubación observamos que existe una rápida y acumulada formación de androstandioles. La formación de androstandioles puede ser inhibida farmacológicamente por Finasteride®, el cual es un inhibidor de las enzimas 5α -esteroide reductasas. Las 5α -esteroide reductasas transforman a la DHT en androstandioles (Pérez-Palacios *et al.*, 2006). Se pensaba que los androstandioles eran metabolitos inactivos, formados para la eliminación de la testosterona, sin embargo se demostró que pueden interactuar con el receptor intracelular de estrógenos y ejercer efectos agonistas de tipo estrogénico y acciones potentes a nivel genómico (Pérez-Palacios *et al.*, 2006). Esto hace suponer que los androstandioles pueden actuar como factores *in situ* intracrínicos o paracrínicos involucrados en la proliferación celular.

Sikora y colaboradores (2009) encontraron que los andrógenos; testosterona y DHT inducen el crecimiento de las líneas celulares MCF-7, T47D y BT-474, bajo condiciones de privación de estrógenos, también señalaron que estas células sobre-regulan las enzimas esteroidogénicas que

pueden metabolizar la conversión de andrógenos a estrógenos. Finalmente indicaron que el metabolito de DHT; 3 α -Adiol tiene un papel de tipo estrogénico en células de cáncer de mama e induce el crecimiento a través de la vía de activación del RE .

Por todo esto surge la interrogante de si las formas reducidas de los andrógenos como el 3 α -Adiol y el 3 β -Adiol son activas y ejercen la función de regular la expresión de la proteína Ciclina D1, en los tejidos de mama, durante el desarrollo y progresión del cáncer de mama, para que se aumente la proliferación celular a través de la interacción con el RE.

3. JUSTIFICACIÓN

En el mundo se destaca el aumento en la incidencia de cáncer de mama, mientras que en México el cáncer de mama es la primera causa de muerte por cuestiones oncológicas; además de que las muertes a causa de esta enfermedad van en aumento. El incremento en su incidencia se atribuye a cambios en la prevalencia de factores de riesgo reproductivos, estilo de vida y diferencias biológicas entre grupos étnicos y raciales. Sin embargo, aún faltan datos que relacionen los factores etiológicos al incremento de esta enfermedad en el país.

En la actualidad, el desafío es generar estrategias efectivas que reviertan la tendencia en la mortalidad, por lo que la detección del cáncer de mama en etapas más tempranas es una estrategia prometedora. Por un lado se sabe que la incidencia del cáncer de mama aumenta después de los 60 años de edad, cuando la actividad ovárica ha disminuido y las concentraciones de estrógenos circulantes son muy bajas. Por el otro lado, el papel de los andrógenos es controversial debido a que tanto pueden actuar como inhibidores como estimular la proliferación de las células cancerosas. Previamente hemos demostrado que los androstandioles (3 α -Adiol y 3 β -Adiol) pueden ejercer efectos de tipo estrogénicos y estimular la proliferación de las células de carcinoma mamario humano MCF-7, cuyo crecimiento depende de estrógenos, aunque se desconoce su mecanismo de acción.

Por tal motivo, el objetivo del presente trabajo de investigación fue indagar el mecanismo de acción de estos metabolitos 5 α -reducidos de la testosterona sobre la regulación de la proliferación en células MCF-7. Los resultados obtenidos en el presente estudio permitirán explicar las posibles razones por las cuales se continúa observando actividad de tipo estrogénica en las mujeres post menopáusicas, mientras que, por otro lado servirán para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas contra el cáncer de mama y de las estrategias empleadas actualmente mediante el uso de inhibidores de la enzima aromatasa o que incrementan la concentración de andrógenos en búsqueda de que éstos inhiban su proliferación.

4. HIPÓTESIS

Si los androstandioles tienen actividad de tipo estrogénica y la capacidad de incrementar la proliferación de las células de carcinoma mamario MCF-7, entonces pueden inducir la síntesis de la ciclina D1 actuando a través de los receptores de estrógenos.

4.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de los androstandioles sobre la expresión del RNAm y de la proteína ciclina D1 en células de carcinoma mamario humano MCF-7 y si su mecanismo de acción es a través de los receptores de estrógenos.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar las condiciones óptimas en las cuales los androstandioles inducen la proliferación de las células MCF-7.

Cuantificar los cambios en la expresión del ARNm y de la proteína Ciclina D1 inducida por los androstandioles en células MCF-7.

Determinar el papel de los receptores de estrógenos, mediante el uso del inhibidor ICI-182-780, sobre la síntesis de la Ciclina D1 inducida por los androstandioles en células MCF-7.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Material Biológico

Para la realización del presente trabajo se utilizó la línea celular MCF-7, derivada de adenocarcinoma mamario humano. Las células, obtenidas por efusión pleural de una metástasis que originalmente proviene de un adenocarcinoma mamario humano, son tumorigénicas, presentan débil actividad metastática *in vitro*, con fenotipo característico de células luminales del epitelio ductal de la mama y expresan ambos receptores de estrógenos (RE⁺, ER⁺), el receptor de andrógenos (RA⁺) y el de progesterona (RP⁺). Las células fueron donadas por el Dr. A. Zentella (Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición, Salvador Zubirán, Ciudad de México).

5.2 Esteroides

Los esteroides que se utilizaron fueron: estradiol (E₂), 5 α -androstano-3 β ,17 β -diol (3 β -Adiol) y 5 α -androstano-3 β ,17 β -diol (3 β -Adiol) y se adquirieron en Sigma (Sigma Chemical Co., EUA).

5.3 Cultivo de las células de la línea MCF-7

El medio de cultivo utilizado para crecer las células fue Medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM; Life Technologies, Gaithersburg, EUA), libre de rojo de fenol, pH ajustado a 7.4 y esterilizado por filtración con poro de 0.22 μ m (Corning, EUA). Al tiempo de realizar la incubación se le agregaron aminoácidos no esenciales hasta la concentración final de 100 μ M, piruvato de sodio 100 μ M, L-glutamina 2 mM, una solución comercial de antibióticos y antimicóticos (100 U/mL de penicilina, 100 μ g/mL de estreptomina y 250 ng/mL de anfotericina B; Life Technologies), así como suero de bovino fetal (SBF; Gibco BRL, Gaithersburg, EUA) al 10% (v/v), previamente inactivado por calor y tratado con una suspensión de carbón activado y dextrán T-70 (10:1) para adsorber los esteroides endógenos (SBF-C).

Las células se cultivaron con medio suplementado con suero bovino fetal, cuya concentración fue disminuyendo de 10%, 5%, 2.5% y finalmente medio suplementado con suero bovino fetal tratado con carbón dextrán (SBF-C 2.5%) para eliminar toda fuente de esteroides (Pérez-Palacios *et al.*, 2006). Las células se incubaron a una atmósfera de 95 %:5 % aire/CO₂ a 37° C.

Para los experimentos de proliferación, las células MCF-7 se sometieron a diferentes tratamientos experimentales con E_2 1nM y concentraciones crecientes de 3β -Adiol, y 3β -Adiol, ($1 \times 10^{-9}M$, $1 \times 10^{-7}M$ y $1 \times 10^{-6}M$), por diferentes períodos de tiempo (24, 48 y 72 h).

Para los experimentos de expresión de la ciclina D1 se sembraron 6×10^6 células en botellas de cultivo con una superficie de 75 cm^2 hasta alcanzar la confluencia. Posteriormente, las células se cosecharon con tripsina al 0.25% y 1 mM de EDTA (ácido etilén diamino tetra acético), se centrifugaron a $286 \times g$ durante cinco min, se desechó el sobrenadante y el botón celular se resuspendió en el medio de cultivo y se sembraron bajo las condiciones experimentales requeridas para realizar el análisis de expresión de los ARNm y de la Ciclina D1. Para medir los niveles de ARNm y proteína de la Ciclina D1, las células MCF-7 se sometieron a diferentes tratamientos experimentales con E_2 (1nM), con 3β -Adiol ($10^{-6}M$) o con 3β -Adiol ($10^{-7}M$), por los siguientes períodos de tiempo: 1, 3, 6, 12 y 21.5 h.

Para determinar la participación de los receptores de estrógenos, se utilizó un antagonista del receptor de estrógenos, el ICI-182-780 (ICI; $10^{-7}M$). Para estos experimentos, las células se incubaron con E_2 ($10^{-9}M$), 3β -Adiol ($10^{-6}M$) en ausencia o presencia del ICI durante 12 h ó 3β -Adiol ($10^{-7}M$) en ausencia o presencia del ICI durante 6 h; tiempo en el cual se observa el efecto máximo de inducción en la expresión de la ciclina D1.

5.4 Estudios de proliferación celular por el Método de Incorporación de la Timidina-[3H]

Las células se sembraron en cajas cámaras multipozo a una densidad aproximada de 5×10^5 células/ cm^2 , conteniendo DMEM suplementado con 10% (v/v) de SFB durante 24 h, lo cual permitió la adhesión celular. Posteriormente, el medio de cultivo se retiró y se reemplazó por DMEM suplementado con 5% y luego con 2.5% (v/v) de SFB-C y se incubaron por 24 h más para permitir que las células se adaptaran al medio libre de esteroides.

Al término de este tiempo, el medio de los cultivos se reemplazó por DMEM suplementado con 2.5% de SFB-C en ausencia o presencia de E_2 , 3β -Adiol y 3β -Adiol en diferentes concentraciones; las células se incubaron por diferentes períodos de tiempo, desde 24 hasta 72 h. Al final de cada periodo de incubación se lavaron las células con PBS para eliminar restos de los tratamientos aplicados.

Para analizar la proliferación celular, primero se adicionó medio fresco que contenía $1 \mu M$ de timidina-[3H] ($1 \mu Ci$ /por pozo) a cada grupo de células y se permitió la incorporación por un periodo de 24 h. Luego se retiró el exceso de la timidina-[3H] en las células realizando dos lavados con solución amortiguadora de fosfatos (PBS). Después las células se fijaron con metanol-PBS (95:5) durante 15

min y nuevamente se lavaron dos veces con PBS. Mas tarde, las células se recuperaron con NaOH 0.2 N y se transfirieron a viales con líquido de centelleo, para que finalmente se obtuviera la cantidad de cuentas por minuto (cpm) en un contador de emisiones beta. A la par con los experimentos de incorporación de timidina-[³H], se utilizaron grupos de células MCF-7 para cuantificar la viabilidad.

5.5 Prueba por exclusión de azul tripano para verificar la viabilidad de las células tratadas

La viabilidad celular se determinó midiendo la habilidad de las células vivas de excluir el colorante azul de tripano a una concentración final del 0.4%.

A las células cultivadas en cajas T-45, se les retiró el medio y se lavaron con una solución de tripsina/EDTA estéril. Se incubaron a 37° C por 5 min, después se agitaron las cajas y se les retiró la tripsina. Se les agregó medio de cultivo a las cajas, posteriormente se homogeneizaron y se colocó 1 mL en cubetas que se colocaron en el contador Vi-CELL™ Series Cell Viability Analyzers (Beckman Coulter, USA) el cual añadió azul tripano a la mezcla que contenía las células.

5.6 Aislamiento del ARNm (RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, USA))

Para realizar los estudios de expresión del ARNm que codifica para la ciclina D1, se utilizaron 6 X 10⁶ de células MCF-7 por experimento, las cuales al crecer en monocapa fue necesario tripzinizarlas y colectarlas. Se siguió el protocolo de "RNeasy® Plus Micro Handbook" (QIAGEN®, 2007). Se realizó el aspirado del DMEM y se lavaron con una solución de PBS. Luego se adicionó tripsina 0.25% en PBS. Una vez que se desprendieron de la caja de Petri, se adicionó DMEM (que contenía SBF para inactivar la tripsina). Las células se transfirieron a un tubo de centrifuga de polipropileno libre de RNasas y se centrifugó a 300 x g por 5 min.

Se aspiró el sobrenadante y se procedió a lisar a las células a través de la resuspensión del botón celular con 500 µL del Buffer RLT plus. Se transfirió el lisado homogenizado a una columna "gDNA Eliminator spin". Se centrifugó por 30 s a 8000 x g se descartó la columna y al sobrenadante se le agregaron 500 µL de etanol al 70% y se mezcló por medio de una continua resuspensión por 10 s. Se procedió a la transferencia de la muestra a una columna "RNeasy MinElute spin", se centrifugó por 15 s a 8000 x g y se descartó el sobrenadante. Se agregaron 700 µL del Buffer RW1 a la columna y se centrifugó por 15 s a 8000 x g para lavar la membrana de la columna, se desechó el sobrenadante. Se adicionó 500 µL del Buffer RPE a la columna y se centrifugó por 15 s a 8000 x g y al final se descartó el sobrenadante. Se agregaron 500 µL de etanol-80% a la columna, se centrifugó por 2 min a la misma velocidad y se eliminó el sobrenadante. Posteriormente se colocó la columna a un nuevo tubo colector

de 2 mL, se centrifugó a 12000 x *g* por 2 min para eliminar los restos de etanol. Finalmente, se preparó la columna sobre un nuevo tubo de 1.5 mL, se adicionaron 50 µL de agua libre de RNasas, se centrifugó a 12000 x *g* por 1 min y en el sobrenadante se obtuvo el ARN total.

La concentración del ARN obtenido se cuantificó por espectrofotometría a una longitud de onda de 260 nm y se determinó la presencia de contaminantes proteicos por el cociente de absorbancias a 260 nm entre 280nm, la cual debió ser mayor de 1.8 para ser utilizado. Las muestras de ARN se guardaron en alícuotas de 10 µg a -70° C hasta el momento de realizar los análisis de expresión.

5.6.1 Análisis de los ARN en electroforesis en geles de agarosa en condiciones desnaturalizantes (Davis *et al.*, 1994)

Para observar la integridad del ARN obtenido se separó con base en su peso molecular mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.0% (Invitrogen; grado Biología Molecular), empleando la solución amortiguadora 1X MOPS (ácido 3-[N-Morfolino] propanosulfónico) y 7% de formaldehído como agente desnaturalizante. Cada muestra de ARN (10 µg) se desnaturalizó por la adición de 10 µL de la solución FMF (50% de formamida, 1X MOPS y 7% de formaldehído) y se calentaron a 75° C en un termobloque (Boekel Industries Inc., USA) por 5 min, se mantuvieron en hielo por 5 min y se centrifugaron a 9000 x *g*. Después de desnaturalizar, a cada muestra se les adicionaron 2 µL de la solución de carga para ARN (30 % de glicerol, 0.1% de azul de bromofenol y 0.1% de xilen cianol) y 0.2 µL de bromuro de etidio (10 µg/mL). Las muestras se depositaron en los pozos del gel, se cubrió totalmente con buffer MOPS 1X y se llevó a cabo el corrimiento a 75 volts por 60-90 min.

5.7 Análisis de la expresión de los genes a través de sus ARNm

Para realizar la determinación semicuantitativa de la expresión de los ARNm, se requirió la síntesis de los amplicones respectivos por medio de las técnicas de retrotranscripción (RT) seguida de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), a partir de los ARN totales obtenidos de cada experimento.

Primero se realizó la obtención del ADN complementario (ADNc) a partir de 500 ng de ARN total, empleando el estuche comercial "Access RT-PCR System" (Promega, EUA) y siguiendo las instrucciones del fabricante.

Se preparó una mezcla de reacción de la combinación de agua libre de nucleasas a un volumen final de 20 μ l, 5 μ l de buffer de reacción *AMV* 0.5X, 0.5 μ l de la mezcla de dNTP's 0.02 mM [10 mM de dATP, dCTP, dGTP y dTTP en agua libre de nucleasas], 0.5 μ l del oligonucleotido sentido 0.25 μ M, 0.5 μ l del oligonucleotido antisentido 0.25 μ M, 0.5 μ l de $MgSO_4$ 0.25 mM, 0.5 μ l de *AMV* Transcriptasa Reversa 1.5 u, 0.5 μ l de *T7* DNA Polimerasa 1.5 u y 1 μ g de ARN total por reacción. La mezcla se colocó en un tubo de pared delgada de 0.2 mL nuevo y estéril.

Primero se realizó la retrotranscripción (RT), para la cual la mezcla de reacción se incubó a 45° C por 23 min, enseguida se inactivó la *AMV* retrotranscritasa con una incubación a 94° C durante 1 min. De forma continua se realizó la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) teniendo las siguientes condiciones: 40 procesos cíclicos, donde cada uno consistió de una fase a 94° C por 15 s (desnaturalización del ADN), de una fase a la temperatura señalada en la tabla 1 para cada gen, por 30 s (alineamiento de los oligonucleótidos) y una fase a 68° C por 1 min (extensión de la cadena de ADN por la ADN polimerasa). Finalmente se realizó una extensión final a 68° C por 3 min.

Con la finalidad de amplificar las secuencias específicas se utilizaron secuencias de oligonucleótidos de 20 pares de bases cada uno, 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 enviaron para su síntesis en una casa comercial (Uniparts, México). 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 proteína - actina humana, cuya expresión es constitutiva en la línea celular utilizada como modelo experimental.

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 pares de bases (pb):

GENES (código Gene Bank)	Secuencia de oligonucleótidos	Tamaño del amplicón Temperatura melting (°C)
Ciclina D1	Sentido 5'- AGA AGC TGT GCA TCT ACA CCG ACA -3' Antisentido 5'- TGA TCT GTT TGT TCT CCT CCG CCT -3'	168 pb (64)
-actina (Normalización)	Sentido 5'- GGC ACC CAG CAC AAT GAA GAT CAA -3' Antisentido 5'- TAG AAG CAT TTG CGG TGG ACG ATG -3'	168 pb (60)

La cinética de las reacciones de PCR para cada par de oligonucleótidos fue determinada por la cantidad de molde. Los productos de PCR se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 2 % (p/v) y como buffer de corrimiento fue TBE al 0.5X (10 mM de Tris Base, 10 mM de ácido bórico y 10 mM de EDTA) a 75 volts por 45 min. 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 al ADN y emite fluorescencia al ser estimulado con luz ultravioleta. Las imágenes se analizaron por densitometría de cada una de las bandas obtenidas en el sistema de análisis de imágenes Gel Logic 200® (Kodak, EUA). Los resultados se expresan en número de pixeles (densidad óptica relativa; DO) del gen de interés con respecto al gen de normalización (-actina). Cada experimento se realizó por triplicado y cada repetición se amplificó al menos dos veces.

Los productos de PCR se purificaron mediante columnas de exclusión molecular para la secuenciación.

5.8 Obtención de las proteínas totales y determinación de los niveles de Ciclina D1

El medio de los cultivos celulares se reemplazó por DMEM suplementado con 2.5% de SBF-C en presencia de E₂, 3 -Androstandiol y 3 -Androstandiol en diferentes concentraciones; las células se incubaron por diferentes períodos de tiempo, desde 1 hasta 21.5 h.

A continuación las células se lavaron con PBS y se despegaron de la superficie de las cajas Petri adicionando 1 mL de tripsina-EDTA 1X 25% (Gibco, USA), se recupero la suspensión celular y se centrifugó durante 5 min a 3 000 x g. Las células precipitadas se resuspendieron en 200 µL de buffer de

lisis M-PER® (Pierce) con inhibidores de proteasas Compleat Mini® (Roche, Suiza) y se incubaron en hielo por espacio de 15 min. Al término de este tiempo las muestras se centrifugaron a 14,000 x g durante 15 min a 4° C. Del sobrenadante recuperado se cuantificó la proteína.

5.8.1 Determinación del contenido de proteína

El contenido de proteína se determinó por el método de Bradford (1979); éste se basa en la unión de un colorante; Coomassie Blue G-250 a las proteínas. El colorante, en solución ácida, existe en dos formas una azul y otra naranja. Las proteínas se unen a la forma azul para formar un complejo proteína-colorante con un coeficiente de extinción mayor que el colorante libre.

Se utilizó el reactivo de Bradford (Bio-Rad, USA), utilizando estándares con concentraciones conocidas de albumina de suero bovino.

5.8.1 Determinación de los niveles de proteína de la Ciclina D1 por Western Blot (*Davis et al. 1994; Ausbel, 1992*)

La determinación de los niveles de ciclina fue realizada por medio de Western blot utilizando anticuerpos policlonales contra la ciclina D1 y α -actina (Santa Cruz Biotechnology, EUA).

Se sembraron 5×10^6 células en cajas Petri de 60 mm de diámetro, se dejó el cultivo estabilizar por 24 h, y posteriormente se sometió al cultivo al tratamiento correspondiente. Terminado el tiempo de tratamiento las células se lavaron con PBS y después se les adicionaron 300 μ L de una solución amortiguadora de lisis. Las células se despegaron con un gendarme de goma. El volumen total se colocó en un microtubo y se dejó en hielo por espacio de 5 min con agitación constante. Pasado este tiempo, la muestra se centrifugó por 20 min a 14000 x g a una temperatura de 4° C. Se recuperó el sobrenadante y se guardó a -80° C.

Se preparó un gel de poliacrilamida al 12% de la siguiente forma: 2.5 mL de solución 1 (TRIS-HCl 0.75 M, SDS 0.2%, pH 8.8), 1.7 mL de solución 2 (archilamida-Bis archilamida 30% proporción 37.5:1), 0.8 mL de agua, 7 μ L de TEMED, 25 μ L de persulfato de amonio al 13 %.

Se pusieron 30 μ g de proteína del lisado total con una solución de muestra 1X (Tris-Cl 0.5 M, pH 6.8, SDS 10%, Azul de bromofenol 1%, Glicerol y DTT 1 M) hasta llegar a un volumen total de 30 μ L. Después, las muestras se incubaron a 95° C por 5 min para desnaturalizarse. Se cargó el total de la muestra anterior en el gel de poliacrilamida, el cual se corrió a 120 volts por 60 min.

Terminada la electroforesis se procedió a la transferencia de la proteína separada a una membrana de transferencia PVDF polyscreen a 290 mA durante 60 min a 4° C en una cámara (BioRad, USA), con 800 mL de una solución de transferencia que contenía: TRIS-base 25 mM, Glicina 192 mM y metanol al 20%, pH 8.3. Terminada la transferencia la membrana se bloqueó con una solución de leche descremada al 8% en una solución de TBS (Tris-base 20 mM, NaCl 137 mM, pH 7.6) por 1 h en agitación constante. Posteriormente se hicieron lavados sucesivos con una solución de Tween 20 al 0.05% en TBS (TBS-Tween 20).

La membrana ya bloqueada se incubó con el anticuerpo primario a una dilución 1:500 en TBS-Tween 20 durante 2 h. Terminado el tiempo de incubación la membrana se sometió a lavados sucesivos con una solución de TBS-Tween 20. Posteriormente la membrana se incubó durante 1 h con un anticuerpo secundario anti-cabra acoplado a una peroxidasa de rábano (Santa Cruz Biotechnology, USA) a una dilución 1:1000 en TBS-Tween 20, a temperatura ambiente y con agitación constante. Terminado el tiempo de incubación la membrana se sometió a lavados sucesivos con una solución de Tween 20 al 0.05% en TBS.

Finalmente la membrana se incubó con un sustrato quimioluminiscente Super Signal® West Pico Substrate (Thermo Scientific Life Science Research Products, USA) por 5 min a temperatura ambiente. Al cabo de este tiempo se secó la membrana, se colocó en una bolsa de plástico y se sometió a autorradiografía y en películas de revelado de tono medio Kodak T-Max 100 (Kodak, EUA), en ausencia de luz blanca. Las imágenes se cuantificaron por densitometría mediante el sistema de análisis de imágenes Gel Logic 200® (Kodak, EUA).

5.9 Análisis estadístico

Cada experimento se realizó por triplicado en al menos tres experimentos independientes. El análisis estadístico de los resultados obtenidos se realizó mediante el análisis de varianza (ANOVA), seguido por la prueba de comparaciones múltiples de Tukey Kramer. El nivel de significancia para ambas pruebas fue de $p = 0.05$.

6. RESULTADOS

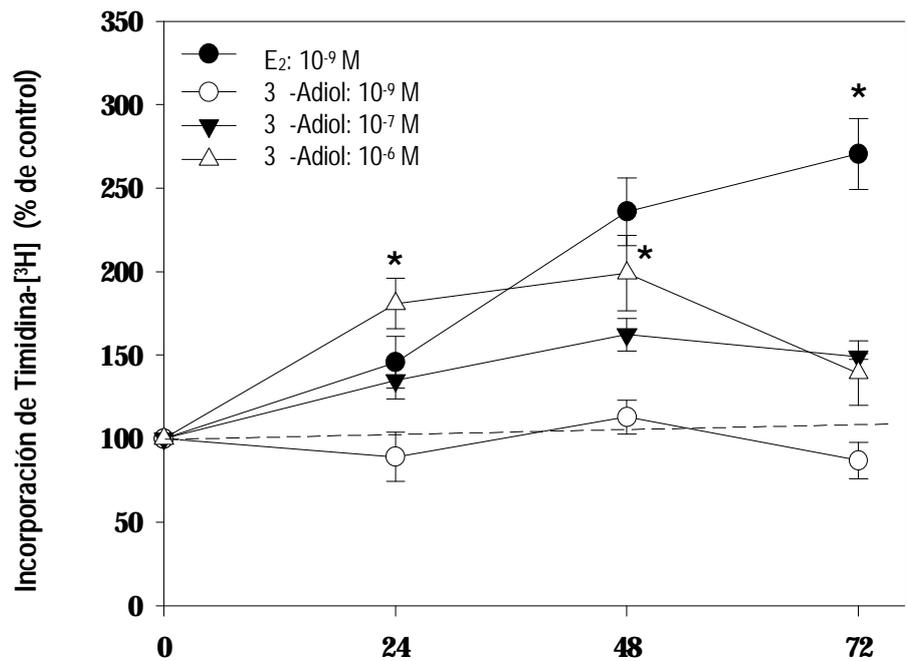
6.1 Efecto de los Androstandioles sobre la proliferación de las células MCF-7

Con la finalidad de conocer las condiciones óptimas en las cuales los androstandioles estimulan la proliferación de las células de carcinoma mamario MCF-7, realizamos ensayos de incorporación de timidina- ^{3}H] utilizando concentraciones crecientes de cada uno de los androstandioles, durante diferentes periodos de tiempo. En la Figura 1A se puede observar que el 3 α -Adiol estimula la proliferación de las células MCF-7 en las concentraciones 10^{-7} M y 10^{-6} M , sin embargo, el 3 α -Adiol 10^{-6} M aumenta la proliferación 50% más. La concentración más baja utilizada (10^{-9} M) no presentó efecto. Los efectos inductores de la proliferación del 3 α -Adiol se incrementan con el tiempo de incubación entre las 24 y las 48 h, disminuyendo a las 72 h. El máximo efecto del 3 α -Adiol se presentó con la concentración 10^{-6} M , durante 48 h de incubación induciendo un aumento de 200% con respecto al control ($p < 0.05$). El control positivo E_2 (10^{-9} M) estimuló la proliferación celular hasta 270% con respecto al control ($p < 0.05$) después de 72 h de exposición.

Por otro lado, el 3 β -Adiol estimuló la proliferación de las células MCF-7 solamente con la concentración de 10^{-7} M , durante 24, 48 y 72 h de incubación, observándose el máximo efecto a las 48 h, casi 3 veces más con respecto al control. Las concentraciones 10^{-9} M y 10^{-6} M del 3 β -Adiol no tuvieron efecto estimulador. A diferencia del 3 α -Adiol, el 3 β -Adiol presentó mayor efecto, siendo de 260% con respecto al control, que el E_2 (220%) a las 48 h de incubación, aunque a las 72 h el E_2 incrementó su efecto, mientras que el 3 β -Adiol no pudo mantener su efecto (Figura 1B).

Ambos Androstandioles fueron capaces de inducir la proliferación celular, con un efecto máximo después de 48 h de incubación, utilizando 10^{-6} M del 3 α -Adiol y 10^{-7} M del 3 β -Adiol, por tal motivo los demás experimentos se realizaron utilizando estas condiciones experimentales y se comparó con E_2 (10^{-9} M) como control positivo.

A) 3 -Adiol



B) 3 -Adiol

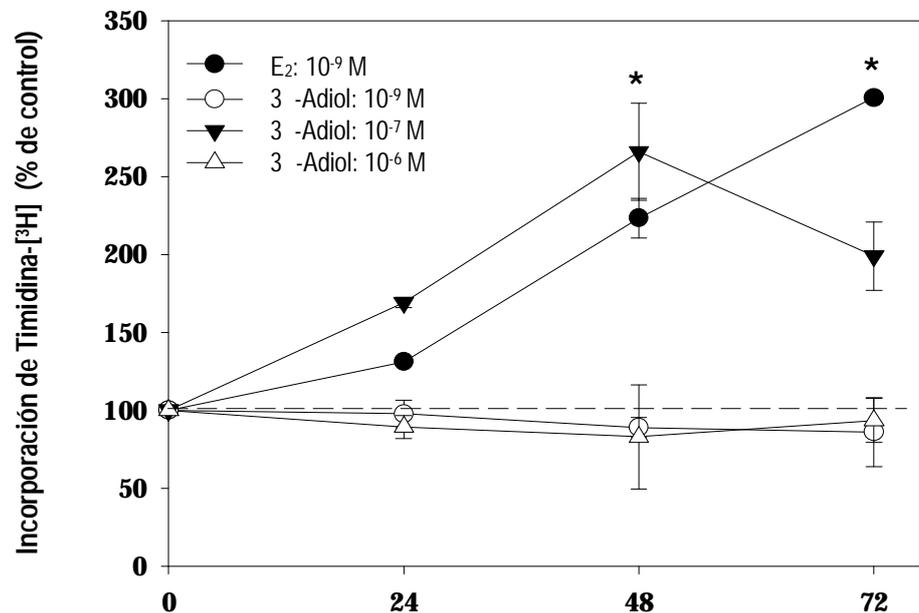


Figura 1.- Efecto de los androstandiolos sobre la proliferación de las células MCF-7, incubadas a diferentes dosis y periodos de tiempo. Como se describió en el método, las células se crecieron en medio libre de suero por 48 h y después fueron tratadas con Estradiol (E_2 ; 10^{-9} M) o con las concentraciones 10^{-9} , 10^{-7} , 10^{-6} M del 3 -Adiol (A) ó del 3 -Adiol (B), durante 24, 48 y 72 h. Las células incubadas con 0.01% de etanol en medio DMEM (vehículo) fueron usadas como testigo (datos no mostrados). La proliferación celular se midió por ensayos de incorporación de timidina- 3H y se normalizaron con la proporción de células muertas/viables, medida por el método de azul tripano. La inducción de la proliferación se expresa como el incremento con respecto al control. Cada punto representa la media \pm la desviación estándar (DS) de al menos tres experimentos realizados por triplicado. * $P < 0.05$ vs control.

6.2 Efecto de los Androstandioles sobre la expresión de la Ciclina D1 en células MCF-7

Se ha demostrado que el estradiol es capaz de estimular la proliferación celular a través de inducir la síntesis de la ciclina D1, entre otros genes. Con la finalidad de cuantificar los cambios en la expresión de la ciclina D1 inducida por cada uno de los androstandioles, se determinó la expresión del ARNm que codifica a la ciclina D1 mediante ensayos de RT-PCR semicuantitativo (Figura 2A) y mediante ensayos de hibridación tipo Western blot para la proteína de la ciclina D1 (Figura 2B).

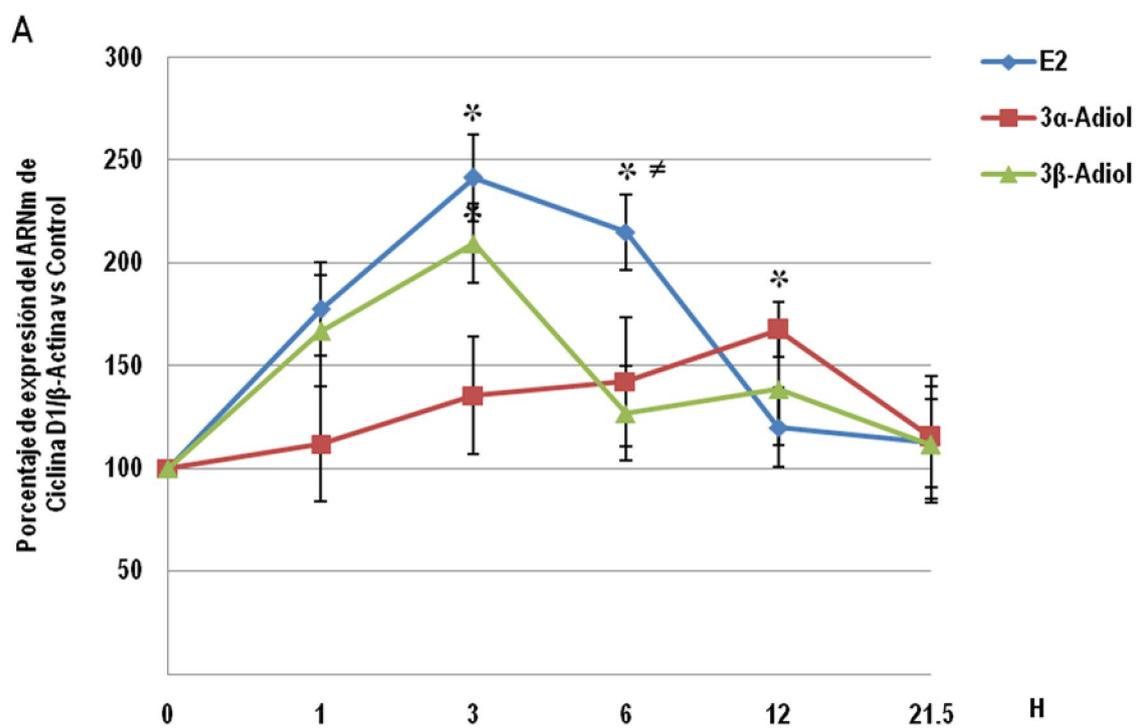
Los Androstandioles se utilizaron en concentraciones de 10^{-6} M del 3 β -Adiol y 10^{-7} M del 3 α -Adiol, debido a que a estas concentraciones fueron capaces de inducir la proliferación celular, con un efecto máximo después de 48 h de incubación y se compararon con E_2 (10^{-9} M) como control positivo.

Se observó que el 3 α -Adiol aumenta significativamente la expresión del ARNm y la ciclina D1 a las 12 h de incubación, iniciando el incremento del ARNm desde las 3 h y teniendo la máxima expresión del 175% con respecto al control. El incremento máximo de la proteína fue del 200% con respecto al control, siendo en ambos casos estadísticamente significativos ($p < 0.05$).

Por otro lado, en forma más rápida el 3 β -Adiol estimuló la síntesis del ARNm y de la ciclina D1, aumentando 210 % el ARNm a las 3 h y 200% la proteína a las 6 h de incubación con respecto al control ($p < 0.05$). La concentración del ARNm disminuye drásticamente a las 6 h, mientras que la concentración de la proteína disminuye paulatinamente hasta las 21.5 h.

Cuando se analiza el efecto inductor del E_2 sobre la expresión de la ciclina D1, se observa que el ARNm se incrementa significativamente (240% vs control; $p < 0.05$) a las 3 h de incubación, mientras que el de la proteína se incrementa rápidamente desde 1 h después del tratamiento (190% vs control) y se mantiene por arriba del 150% hasta las 12 h, regresando a niveles basales de expresión a las 21.5 h de incubación.

Ambos Androstandioles fueron capaces de estimular la síntesis de la ciclina D1, tanto en ARNm como la proteína de manera semejante que el estradiol, pero en tiempos más largos, ya que el 3β -Adiol (10^{-6} M) presentó el máximo estímulo de la proteína a las 12 y el 3α -Adiol (10^{-7} M) a las 6 h, en comparación con el E_2 (10^{-9} M) que induce su expresión desde 1 h de incubación. Cabe señalar que los resultados de expresión de la ciclina D1 son congruentes con la expresión de su ARNm.



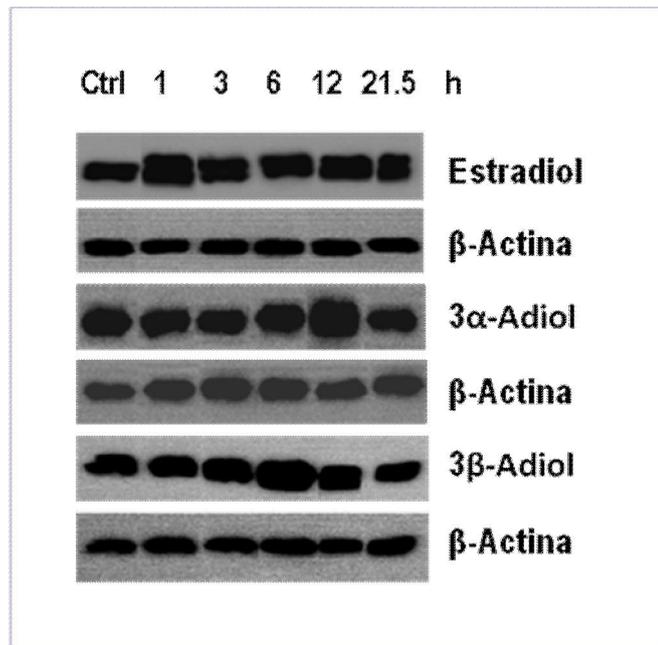
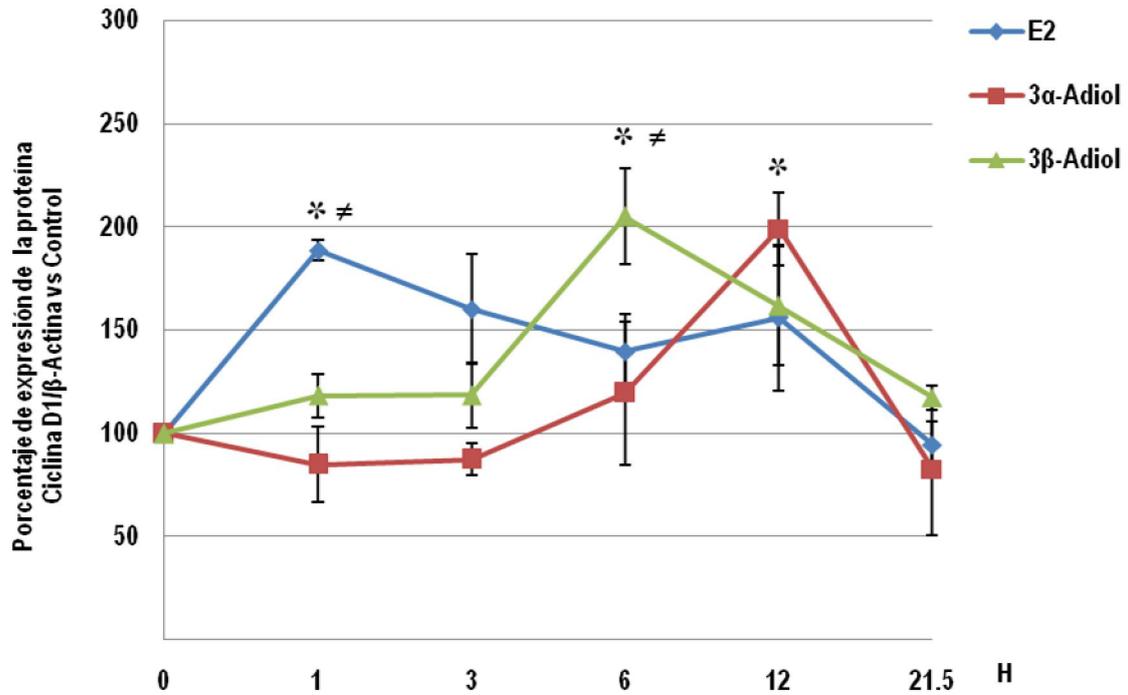
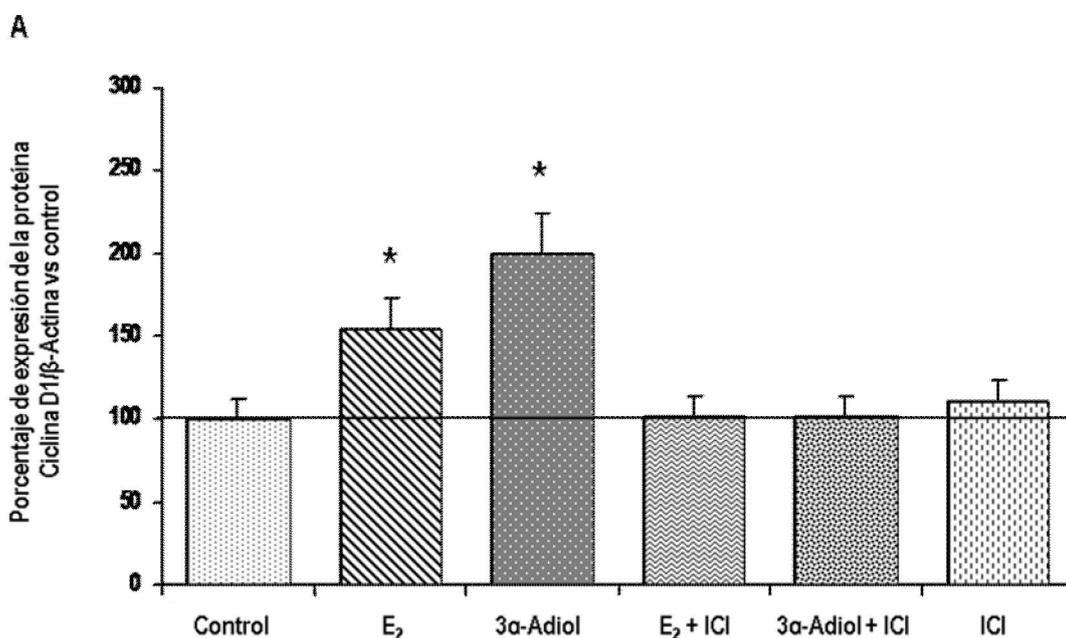
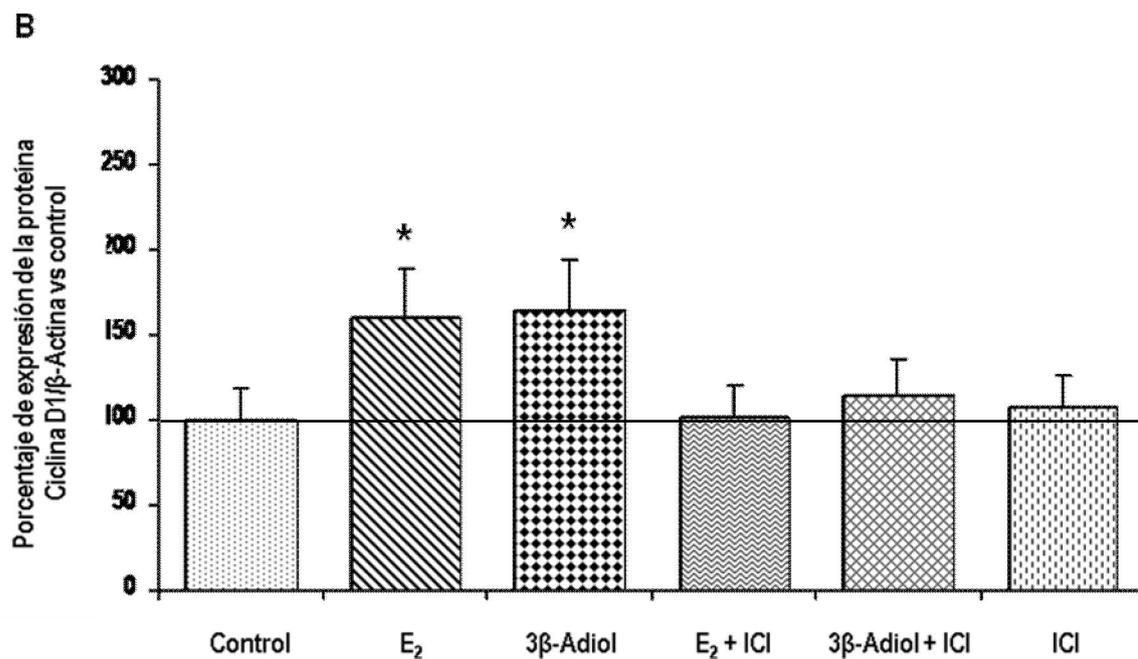
B

Figura 2.- Efecto de los Androstandioles sobre la expresión del ARNm (A) y proteína de la ciclina D1 (B) en las células MCF-7. Los niveles del ARNm y proteína de la ciclina D1 incrementaron significativamente comparados con el control después del tratamiento con 3-Adiol (10^{-6} M) o 3-Adiol (10^{-7} M), en forma semejante al estradiol (E_2 ; 10^{-9} M) pero en diferentes periodos de tiempo. La expresión del ARNm se midió por RT-PCR. La expresión de proteínas se realizó por Western blot. La inducción de la expresión se expresa como el cociente con respecto al control de normalización, β -actina y el control representa el 100%. Cada punto representa la media \pm DS de al menos tres experimentos realizados por triplicado. * $P < 0.05$ vs control. $P < 0.05$ para comparaciones múltiples.

6.3 Participación de los Receptores de Estrógenos en la inducción de la expresión de la ciclina D1 por los Androstandioles en células MCF-7

Una vez demostrado que ambos androstandioles son capaces de inducir la síntesis de la ciclina D1, de manera semejante al estradiol, se procedió a determinar si el efecto puede ser bloqueado mediante el uso de un antagonista del receptor de estrógenos, el ICI-182-780 (ICI; 10^{-7} M). Se realizaron experimentos donde las células se incubaron con E_2 (10^{-9} M), 3 α -Adiol (10^{-6} M) ó 3 α -Adiol (10^{-7} M) en presencia o ausencia del ICI. El 3 α -Adiol (10^{-6} M) se incubó por un periodo de 12 h, mientras el 3 α -Adiol (10^{-7} M) se incubó durante 6 h debido a que en estos tiempos de exposición de cada uno de los tratamientos se observó la inducción máxima en la expresión de la proteína de la ciclina D1. Los resultados demostraron que el antagonista del receptor de estrógenos bloquea totalmente la expresión de la proteína de la ciclina D1, tanto para el E_2 como para ambos androstandioles (Figura 3).





*Figura 3.- (A) Efecto del 3 -Adiol (10^6 M) y (B) del 3 -Adiol (10^7 M), sobre la expresión de la ciclina D1, en ausencia o presencia de un antagonista de los RE (ICI-182-780) en las células MCF-7. Los niveles de expresión de la ciclina D1 incrementaron significativamente comparados con el control después del tratamiento con 3 -Adiol (10^6 M) o 3 -Adiol (10^7 M), en forma semejante al estradiol (E₂; 10^{-9} M) pero en diferentes periodos de tiempo. El aumento en la expresión observado con el E₂ y con cada uno de los androstandioles, se abate cuando se trató a las células MCF-7 con E₂; 10^{-9} M, 3 -Adiol (10^6 M) o 3 -Adiol (10^7 M) en presencia del ICI. Como control positivo se empleó E₂ (10^{-9} M). La inducción de la expresión se expresa como el cociente con respecto al control de normalización, -actina y el control representa el 100%. Cada punto representa la media \pm DS de al menos tres experimentos realizados por triplicado. * $P < 0.05$ vs control.*

7. DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

Está plenamente demostrado que los estrógenos juegan un papel determinante en el desarrollo y progresión del cáncer de mama. Su participación en la progresión del ciclo de células cancerosas se asocia con la inducción de la expresión y la activación de muchos factores que estimulan la proliferación celular (Hilakivi-Clarke *et al.*, 2002; Jerry *et al.*, 2010; Maynadier *et al.*, 2008). Cuando la actividad ovárica disminuye durante la menopausia, se ha observado que la concentración de estrógenos disminuye dramáticamente y en esta etapa las células cancerosas proliferan a mayor velocidad, aunque no se ha determinado el mecanismo por el cual se presenta este fenómeno (Blair, 2010; Frye, 2009; Shifren y Schiff, 2010).

Se ha reportado que durante la menopausia se presenta un incremento en los niveles de los andrógenos, respaldando la hipótesis planteada por el grupo de investigación de Grattarola, donde se propuso por primera vez que los niveles de andrógenos en mujeres en la etapa de menopausia se incrementan y además planteó que este incremento se correlaciona con una mayor incidencia de cáncer de mama (Grattarola *et al.*, 1974, Grattarola *et al.*, 1975). Este trabajo ha sido retomado por diferentes grupos de investigación y han confirmado que en las mujeres con menopausia incrementan los niveles de andrógenos, principalmente la testosterona y la dihidrotestosterona, este incremento de los andrógenos aumenta el riesgo de desarrollar cáncer de mama (Kaaks *et al.*, 2005). No obstante, la participación de los andrógenos en el cáncer de mama aún es controversial debido a que pueden presentar efectos tanto estimulatorios como inhibitorios de la proliferación de las células cancerosas (Aka *et al.*, 2010; Dimitrakakis y Bondy, 2009; Nagasaki *et al.*, 2009; Penning y Byrns, 2009; Shufelt y Braunstein, 2009). Se han realizado numerosos estudios sobre los efectos de los andrógenos sobre el crecimiento de las células de cáncer de mama, pero la mayoría han sido enfocados sobre el papel de la testosterona y la 5 α -dihidrotestosterona (Aka *et al.*, 2010; Lin *et al.*, 2009). Birrel y sus colaboradores demostraron que el metabolito de la testosterona, la DHT inhibe la proliferación de las líneas celulares T47-D y ZR-75-1, pero induce la proliferación de las líneas de cáncer de mama MCF-7 y MDA-MB-435. Estos datos sugieren que la acción de los andrógenos en las líneas celulares de cáncer de mama puede estar regulada por la unión a otros receptores, aparte de la unión al receptor de andrógenos. Además se propone que los metabolitos de la DHT; los androstandioles se pueden unir a los receptores de estrógenos, ejercer un efecto de tipo estrogénico y de esta forma se pueden explicar las respuestas divergentes de los andrógenos que se observaron en las diferentes líneas celulares (Birrel *et al.*, 1995). En el presente trabajo demostramos que los androstandioles, metabolitos 5-alfa reducidos, no aromatizables de la testosterona, inducen la proliferación de las células de carcinoma mamario humano

con igual intensidad que el estradiol pero empleando concentraciones 100 y 1000 veces mayores del 3 β -Adiol y del 3 α -Adiol, respectivamente. Esta es la primera ocasión en la cual se demuestra que los androstandioles pueden estimular la proliferación.

Ambos androstandioles tienen la capacidad de unirse a los receptores de estrógenos. Se ha demostrado que el 3 β -Adiol puede unirse tanto al RE α , como al RE β con aproximadamente 30 y 14 veces menos afinidad relativa que el E₂, respectivamente. Lo anterior sugiere que el 3 β -Adiol tiene menor afinidad por el RE α (Kuiper *et al.*, 1997). También se demostró que el 3 β -Adiol es un ligando para el RE β y que tiene menor afinidad de unión que el E₂ (Pettersson *et al.*, 2008; Pak *et al.*, 2005).

Weihua y colaboradores demostraron que el 3 β -Adiol presenta efectos anti-proliferativos en el cáncer de próstata, vía activación del RE α (Weihua *et al.*, 2002). Estos estudios dilucidan el papel del 3 β -Adiol en el cáncer de próstata, sin embargo poco se sabe acerca de la importancia de este metabolito en el cáncer de mama (Maggiolini *et al.*, 1999; Ishikawa *et al.*, 2006).

En este estudio nosotros reportamos que los androstandioles pueden inducir la proliferación de las células del cáncer de mama, a través de la activación del RE. Además de la inducción del crecimiento, los androstandioles son capaces de inducir la síntesis de la ciclina D1, la cual es un blanco bien definido de la acción de los estrógenos. El E₂ incrementa la expresión de la ciclina D1 después de 1 h de incubación, mientras que el 3 β -Adiol y el 3 α -Adiol requieren tiempos más prolongados (5 y 11 h más, respectivamente) para llevar a cabo su acción. Este retardo se puede deber a que el 3 β -Adiol es 10 veces más potente que el 3 α -Adiol para activar genes reporteros dependientes de estrógenos, pero 100 veces menos que el E₂ (Pérez-Palacios *et al.*, 2006). Se conoce que en las células MCF-7 la transición de la fase G1-S requiere de 12 h, pasando por la mitad de la fase G1 aproximadamente a las 6 h. Sin embargo es importante tomar en cuenta que la proteína de la ciclina D1 tiene un tiempo de vida corto, de aproximadamente 25 a 30 min. Estos resultados contrastan con un estudio reciente (2010) donde se demuestra que el gen que codifica a la ciclina D1 es inhibido por DHT, a través de su interacción con el RA y éste a su vez con un elemento que responde a andrógenos (ERA) en el promotor proximal del gen de la ciclina (D1CCND1), en la región -570 a -556 corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción (Lanzino *et al.*, 2010).

El efecto del E₂ sobre el incremento en la expresión de la proteína ciclina D1 parece estar regulada transcripcionalmente, ya que un incremento en la expresión del ARNm de la ciclina D1 precede cambios en la proteína. Además se demostró que el incremento en la expresión de la proteína inducido por los estrógenos, se abate cuando las células son tratadas con un antagonista del RE, el ICI-182-780, esto indica que la expresión de la ciclina D1 es directamente regulada mediante este receptor.

El modelo clásico de la acción del estradiol involucra la activación de los receptores nucleares RE α y RE β , dependiente de un ligando; estos dos receptores pueden interactuar con el elemento que responde a estrógenos (ERE) en los promotores de genes blanco. La unión de todos estos elementos permite reclutar varios co-activadores que median la regulación transcripcional. Sin embargo, la región del promotor de la ciclina D1 no tiene un ERE clásico. Se ha sugerido que el RE también regula la transcripción a través de mecanismos "no clásicos" en sitios que se unen a factores de transcripción heterólogos como Sp1, c-Jun/ATF-2 y AP-1, probablemente por una interacción proteína-proteína, una vez que el RE no se une a estos sitios directamente (McDonnell y Norris, 2002). La evidencia indica que el E₂ induce efectos no genómicos, por una vía de señalización más comúnmente asociada a la activación de factores de crecimiento y receptores de superficie celular. La inducción a través del RE puede explicarse debido a un elemento que responde a AMPc, el cual se encuentra cerca del sitio de inicio de la transcripción y un sitio más distal de unión a Sp1. Un sitio AP-1 particularmente tiene una función que se superpone con el elemento que responde a AMPc a través del cual se media la respuesta de los estrógenos (Liu et al., 2002) Por lo anterior resulta interesante dilucidar cual es el mecanismo de interacción del RE con el promotor de la ciclina D1.

Estos descubrimientos permiten proponer la posibilidad de que en ausencia de estrógenos, los androstandioles pueden ser un importante mediador de la proliferación de las células de cáncer de mama MCF-7, a través de la inducción de la ciclina D1, la cual permite que se lleve a cabo la progresión del ciclo celular.

Por otro lado, se reportó que las concentraciones en plasma de humano de los androstandioles son aproximadamente 1.5 nM (Voigt y Bartsch, 1986), mientras que en el suero de mujeres postmenopáusicas las concentraciones se encuentran entre 5-10 nM (Labrie et al., 1997). Estas son concentraciones relativamente bajas de androstandioles circulante, sin embargo, estas concentraciones pueden ser suficientes para dirigir el crecimiento de un tumor en ausencia de los estrógenos, particularmente en mujeres que atraviesan por la etapa de menopausia, donde las concentraciones de estrógenos disminuyen radicalmente. Además, reportes anteriores han señalado que las células de cáncer de mama pueden presentar hipersensibilidad hacia concentraciones extremadamente bajas, después de un largo periodo de tiempo de privación de estrógenos (Masamura et al., 1995).

La importancia de estos resultados se resalta por el hecho de que previamente demostramos que las células de carcinoma mamario humano son capaces de biosintetizar androstandioles a partir de testosterona, utilizando DHT como intermediario (Pérez-Palacios, *et al.*, 2006), además éstos pueden ser producidos en los tejidos de carcinoma mamario. Se han asociado positivamente altas concentraciones de testosterona intratumorales con el incremento de la expresión de las enzimas 5 - reductasa tipo 1, 3 -hidroxiesteroide deshidrogena, 3 - hidroxiesteroide deshidrogena y la presencia del RA (Suzuki *et al.*, 2007). Estas enzimas son capaces de biotransformar a la testosterona hacia DHT y posteriormente hacia los androstandioles. Estos datos sugieren que los androstandioles están presentes en tejido con cáncer de mama y pueden estimular la proliferación celular en condiciones de bajas concentraciones de estrógenos o cuando se utilizan inhibidores de la enzima aromatasa en la terapia antineoplásica. El significado biológico del estímulo de la ciclina D1 por los androstandioles y la inhibición por parte de la DHT, se puede utilizar en estudios clínicos ya que se puede favorecer la acumulación de ese último andrógeno al bloquear selectivamente las enzimas aromatasas y las 3 - y 3 - hidroxiesteroide deshidrogenasa. Este tipo de terapia puede ser de gran utilidad, en particular cuando el tumor expresa tanto el RA como el RE , generando nuevos acercamientos moleculares y potenciar la efectividad de las terapias existentes en el tratamiento contra el cáncer de mama.

8. PERSPECTIVAS

Los resultados obtenidos en este estudio indican que ambos androstandioles inducen la expresión de la ciclina D1, sin embargo, es de gran importancia dilucidar el mecanismo por el cual se lleva a cabo esta regulación en la expresión. De igual manera, sería de gran valor clínico evaluar la participación de los androstandioles sobre la proliferación celular en un modelo de cultivo primario de biopsias de pacientes con cáncer de mama.

9. BIBLIOGRAFIA

- Aaltonen K, Amini RM, Landberg G, Eerola H, Aittomäki K, Heikkilä P, Nevanlinna H, Blomqvist C. 2008. Cyclin D1 expression is associated with poor prognostic features in estrogen receptor positive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 381-390.
- Aboghe DH, Bolduc C, Yoshioka M, St-Amand J. 2008. Effects of dihydrotestosterone on gene expression in mammary gland. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 111:225-231.
- Adly L, Hill D, Sherman ME, Sturgeon SR, Fears T, Mies C, Ziegler RG, Hoover RN, Schairer C. 2006. Serum concentrations of estrogen, sex hormone-binding globulin, and androgen and risk of breast cancer in postmenopausal women. *Int J Cancer.* 119:2402-2407.
- Aka JA, Mazumdar M, Chen CQ, Poirier D, Lin SX. 2010. 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 stimulates breast cancer by dihydrotestosterone inactivation in addition to estradiol production. *Mol Endocrinol.* 24:832-845.
- Allred DC, Carlson RW, Berry DA, Burstein HJ, Edge SB, Goldstein LJ, Gown A, Hammond ME, Iglehart JD, Moench S, Pierce LJ, Ravdin P, Schnitt SJ, Wolff AC. 2009. NCCN task force report: Estrogen receptor and progesterone receptor testing in breast cancer by immunohistochemistry. *J Natl Compr Canc Netw.* 6:121-123.
- Amir E, Freedman OC, Seruga B, Evans DG. 2010. Assessing women at high risk of breast cancer: a review of risk assessment models. *J Natl Cancer Inst.* 102:680-691.
- Aspinall SR, Stamp S, Davison A, Shenton BK, Lennard TWJ, 2004. The proliferative effects of 5-androstene-3, 17 -diol and 5 -dihydrotestosterone on cell cycle analysis and cell proliferation in MCF7, T47D and MDAMB231 breast cancer cell lines. *J Steroid Biochem and Mol Biol.* 88:37-51.
- Ausbel FM. 1992. *Short Protocols in Molecular Biology. A compendium of methods from Current Protocols in Molecular Biology.* 2nd Edition. John Wiley & Sons, NY, USA. pp 3-28.
- Beleut M, Rajaram RD, Caikovski M, Ayyanan A, Germano D, Choi Y, Schneider P, Brisken C. 2010. Two distinct mechanisms underlie progesterone-induced proliferation in the mammary gland. *Proc Natl Acad Sci.* 107:2989-2994.
- Birrel SN, Bentel JM, Hickey TE, Ricciardeli C, Weger MA, Horsfall DJ. 1995. Androgens induce divergent proliferative responses in human breast cancer cell lines. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 52:459-567.

- Blair IA. 2010. Analysis of estrogens in serum and plasma from postmenopausal women: past present, and future. *Steroids*. 75:297-306.

- Bosco EE, Knudsen ES. 2007. RB in Breast Cancer: At the Crossroad of tumogenesis and treatment. *Cell cycle*. 6:667-671.

- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 72:248-254.

- Brettes JP, Mathelin C. 2008. Dual effects of androgens on mammary gland. *Bull Cancer*. 95:495-502.

- Brody JG. 2010. Everyday exposures and breast cancer. *Rev Environ Health*. 25:1-7.

- Butt AJ, Caldon CE, McNeil CM, Swarbrick A, Musgrove EA, Sutherland RL. 2008. Cell cycle machinery: link with genesis and treatment of breast cancer, *Adv Exp Med Biol*. 630:189-205.

- Davis L, Kuehl M, Battey J. 1994. *Basic methods in Molecular Biology*. Elsevier Science Publishing Co. Inc. N Y. USA. pp 15-30, 113-140, 189-235.

- Darbre PD, Charles AK. 2010. Environmental oestrogens and breast cancer: evidence for combined involvement of dietary, household and cosmetic xenoestrogens. *Anticancer Res*. 30:815-827.

- Dimitrakakis C, Bondy C. 2009. Androgens and the breast. *Breast Cancer Res*. 11:212-221.

- Doisneau-Sixou SF, Sergio CM, 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.

- Eliassen AH, Missmer SA, Tworoger SS, Hankinson SE. 2006. Endogenous steroid hormone concentrations and risk of breast cancer: does the association vary by a woman's predicted breast cancer risk?. *J Clin Oncol*. 24:1823-1830.

- Fernandez SV, Russo J. 2010. Estrogen and xenoestrogens in breast cancer. *Toxicol Pathol*. 38:110-122.

- Files JA, Ko MG, Pruthi S. 2010. Managing aromatase inhibitors in breast cancer survivors: not just for oncologists. *Mayo Clin Proc*. 85:560-566.

- Frye CA. 2009. Steroids, reproductive endocrine function, and affect. A review. *Minerva Ginecol*. 61:541-562.

- Gaffield ME, Culwell KR, Ravi A. 2009. Oral contraceptives and family history of breast cancer. *Contraception* 80:372-380.
- Grattarola R, Secreto G, Recchione C, Castella W. 1974. Androgens in breast cancer: Endometrial adenocarcinoma and breast cancer in married postmenopausal women. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 77:173-178.
- Grattarola R, Secreto G, Recchione C. 1975. Androgens in breast cancer: Breast cancer recurrences years after mastectomy and increased androgenic activity. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 727:169-172.
- Ge Y, Sneige N, Eltorky MA, Wang Z, Lin E, Gong Y, Guo M. 2009. Immunohistochemical characterization of subtypes of male breast carcinoma. *Breast Cancer Res.* 11:1-8.
- Greeve MA, Allan RK, Harvey JM y Bentel JM. 2004. Inhibition of MCF-7 breast cancer cell proliferation by 5alpha-dihydrotestosterone; a role for p21 (Cip1/Waf1). *J Mol Endocrinol.* 32:793-810.
- Hilakivi-Clarke L, Cabanes A, Olivo S, Kerr L, Bouker KB, Clarke R. 2002. Do estrogens always increase breast cancer risk? *J Steroid Biochem Mol Biol.* 80:163-174.
- INEGI. Estadística a propósito del día mundial contra el cáncer. 2010. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática y Secretaría de Salud, México, D.F.
- .
- Ishikawa T, Glidewell-Kenney C, Jameson JL 2006. Aromatase-independent testosterone conversion into estrogenic steroids is inhibited by 5alpha-reductase inhibitors. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 98:133-138.
- Jacobsen BM, Schittone SA, Richer JK, Horwitz KB. 2005. Progesterone-independent effects of human progesterone receptors (PRs) in estrogen receptor-positive breast cancer: PR isoform-specific gene regulation and tumor biology. *Mol Endocrinol.* 19:574-587.
- Jerry DJ, Dunphy KA, Hagen MJ. 2010. Estrogens, regulation of p53 and breast cancer risk: a balancing act. *Cell Mol Life Sci.* 67:1017-1023.
- Jiang T, Guo Z, Dai B. 2004. Bi-directional regulation between tyrosine kinase Etk/BMX and tumor suppressor p53 in response to DNA damage. *J Biol Chem.* 279:50181-9.
- Kaaks R, Berrino F, Key T, Rinaldi S, Dossus L, Biessy C, Secreto C, Amiano P, Bingham S, Boeing H, Bas Bueno de Mesquita , Chang-Claude J , Clavel-Chapelon F, Fournier A, H. van Gils H, Gonzalez CA , Barricarte A, Gurrea , Critselis E, Tee Khaw K, Krogh V, Lahmann PH, Nagel G, Olsen A, Onland-Moret N, Overvad K, Palli D, Panico S, Peeters P, Quirós JR, Roddam A, Thiebaut A, Tjønneland A, Chirlaque MD, Trichopoulou A,

Trichopoulos D, Tumino R, Vineis P, Norat T, Ferrari P, Slimani N, Riboli E. 2005. Serum Sex Steroids in Premenopausal Women and Breast Cancer Risk Within the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC). *J Natl Can Inst.* 97:755-765.

- Khan N, Afaq F, Mukhtar H. 2010. Lifestyle as risk factor for cancer: Evidence from human studies. *Cancer Lett* 293:133-143.

- Knaul FM, López-Carillo L, et al. 2009. México Reporte Rosa 2009-2010: Cáncer de mama a conciencia. Informe final. México, DF: Fundación Mexicana para la Salud.

- Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Haggblom J, Nilsson S. 1997. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinol.* 138:863-870.

- Kumar V, Cotran R, Robbins S. 2001. Capítulo 6 Neoplasia de Patología Humana, Sexta edición, McGraw-Hill Interamericana Editores, México D.F. pp 144-190.

- Labrie F. 2006. Dehydroepiandrosterone, androgens and the mammary gland. *Gynecol Endocrinol.* 22:118-130.

- Labrie F, Luu-The V, Bélanger A, Lin S-X, Simard J, Pelletier G, Labrie C. 2005. Is dehydroepiandrosterone a hormone?. *J Endocrinol.* 187:169–196.

- Labrie F, Luu-The V, Lin S-X, Labrie C, Simard J, Breton R, Bélanger A. 1997. The key role of 17 - hydroxysteroid dehydrogenases in sex steroid biology. *Steroids* 62: 148-158.

- Lamont KR, Tindall DJ. 2010. Androgen regulation of gene expression. *Adv Cancer Res.* 107:137-162.

- Lanzino M, Sisci D, Morelli C, Garofalo C, Catalano S, Casaburi I, Capparelli C, Giordano C, Giordano F, Maggiolini M, Andò S. 2010. Inhibition of cyclin D1 expression by androgen receptor in breast cancer cells- identification of a novel androgen response element. *Nucleic Acids Res* Apr. 26-35.

- Lin HY, Sun M, Lin C, Tang HY, London D, Shih A, Davis FB, Davis PJ. 2009. Androgen-induced human breast cancer cell proliferation is mediated by discrete mechanisms in estrogen receptor-alpha-positive and -negative breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 113:182-188.

- Liu MM, Albanese C, Anderson CM, Hilty K, Webb P, Uht RM, Price RH Jr, Pestell RG y Kushner PJ. 2002. Opposing action of estrogen receptors alpha and beta on cyclin D1 gene expression. *J. Biol. Chem.* 277:24353–24360.

- Maggiolini M, Donze O, Jeannin E, Ando S, Picard D. 1999. Adrenal androgens stimulate the proliferation of breast cancer cells as direct activators of estrogen receptor alpha. *Cancer Res.* 59:4864-4869.
- Masamura S, Santner SJ, Heitjan DF, Santen RJ. 1995. Estrogen deprivation causes estradiol hypersensitivity in human breast cancer cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 80:2918-2925.
- Matsuura I, Denissova NG, Wang G, He D, Long J, Liu F. 2004. Cyclin-dependent kinases regulate the antiproliferative functions of Smads. *Nature.* 430:226-231.
- Maynadier M, Nirdé P, Ramirez JM, Cathiard AM, Platet N, Chambon M, Garcia M. 2008. Role of estrogens and their receptors in adhesion and invasiveness of breast cancer cells. *Adv Exp Med Biol.* 617:485-91.
- McTiernan A, LieLing W, Barnabei VM, Chen Ch, Hendrix S, Modugno F, Rohan T, Stanczyk F, Wang C.Y. 2008. Relation of demographic factors, menstrual history, reproduction and medication use to sex hormone levels in postmenopausal women. *Breast Cancer Res Treat.* 108:217-231.
- Millau JF, Mai S, Bastien N, Drouin R. 2010. p53 functions and cell lines: have we learned the lesson from the past?. *Bioessays.* 32:392-400.
- Moinfar F, Okcu M, Tsybrovskyy O. 2003. Androgen receptors frequently are expressed in breast carcinomas: potential relevance to new therapeutic strategies *Cancer.* 98:703–711.
- Nadji M, Gomez-Fernandez C, Ganjei-Azar P, Morales AR. 2005. Immunohistochemistry of Estrogen and Progesterone Receptors Reconsidered. Experience With 5,993 Breast Cancers. *Am J Clin Pathol.* 123:21-27.
- Nagasaki S, Miki Y, Akahira J, Suzuki T, Sasano H. 2009. 17beta-hydroxysteroid dehydrogenases in human breast cancer. *Ann N Y Acad Sci.* 1155:25-32.
- Organización Mundial de la Salud [OMS]. 2010. Cáncer; **nota descriptiva 297**
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/index.html>
- Pagani O, Senkus E, Wood W, Colleoni M, Cufer T, Kyriakides S, Costa A, Winer EP, Cardoso F. 2010. ESO-MBC Task Force. International guidelines for management of metastatic breast cancer: can metastatic breast cancer be cured? *J Natl Cancer Inst* 102:456-463
- Page JH, Colditz GA, Rifai N, Barbieri RL, Willett WC, Hankinson SE. 2004. Plasma adrenal androgen and risk of breast cancer in premenopausal woman. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 13:1032-1036.

- Pak TR, Chung WC, Lund TD, Hinds LR, Clay CM, Handa RJ. 2005. The androgen metabolite, 5 α -androstane-3 β ,17 β -diol, is a potent modulator of estrogen receptor- β 1-mediated gene transcription in neuronal cells. *Endocrinology*. 146:147-155.

- Penning TM, Byrns MC. 2009. Steroid hormone transforming aldo-keto reductases and cancer. *Ann N Y Acad Sci*. 1155:33-42.

- Pérez-Palacios G, Santillán R, García-Becerra R, Borja-Cacho, Larrea F, Damián-Matsumura P, González L, Lemus AE. 2006. Enhanced formation of non-phenolic androgen metabolites with intrinsic oestrogen-like gene transactivation potency in human breast cancer cells: a distinctive metabolic pattern. *Journal of Endocrinology* 190:805-818.

- Pettersson H, Holmberg L, Axelson M, Norlin M. 2008. CYP7B1-mediated metabolism of dehydroepiandrosterone and 5 α -androstane-3 β , 17 β -diol – potential role(s) for estrogen signaling. *FEBS J*. 275:1778-1789.

- Porter PL. 2009. Global trends in breast cancer incidence and mortality. *Salud Publica Mex* 51 Suppl. 2:141-146.

- Sasano H, Suzuki T, Nakata T, Moriya T. 2006. New development in intracrinology of breast carcinoma. *Breast Cancer*. 13:129-136.

- Schmitt E, Paquet C, Beauchemin M, Bertrand R. 2007. DNA Damage response network at the crossroads of cell-cycle checkpoints, cellular senescence and apoptosis, *J Zhejiang Univ Sci B*. 8:377-397.

- Seetharaman B, Christopher JB, Suresh KR, Rakesh K. 2004. Estrogen receptor activation at serine 305 is sufficient to upregulate cyclin D1 in breast cancer cells. *FEBS Letters*. 567:243-247.

- Seville LL, Shan N, Westwell AD, Chan WC. 2005. Modulation of pRB/E2F functions in the regulation of cell cycle and in cancer. *Curr Cancer Drug Targets*. 5:159-170.

- Shapiro GI. 2006. Cyclin-Dependent Kinase Pathways As Targets for Cancer treatment, *Journal of Clinical Oncol Biol Neopl*. 10:1770-1782.

- Sherr CH, Roberts JM. 2004. Living with or without and cyclin-dependent kinases, *Genes and Dev*. 18: 2699-2711.

- Shifren JL, Schiff I. 2010. Role of hormone therapy in the management of menopause. *Obstet Gynecol.* 115(4):839-55.

- Shiozawa T, Miyamoto T, Kashima H, Nakayama K, Nikaido T, Konishi I. 2004. Estrogen-induced proliferation of normal endometrial glandular cells is initiated by transcriptional activation of cyclin D1 via binding of c-jun to an AP-1 sequence. *Oncogene.* 23:8603-8610.

- Shu XO, Moore DB, Cai Q. 2005. Association of cyclin D1 genotype with breast cancer risk and survival. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 14:91-97.

- Shufelt CL, Braunstein GD. 2008. Testosterone and the breast. *Menopause Int.* 14(3):117-22.

- Shufelt CL, Braunstein GD. 2009. Safety of testosterone use in women. *Maturitas* 63:63-66.

- Sikora MJ, Cordero KE, Larios JM, Johnson MD, Lippman ME, Rae JM. 2009. The androgen metabolite 5 - androstane-3 ,17 -diol (3 -Adiol) induces breast cancer growth via estrogen receptor: implications for aromatase inhibitor resistance. *Breast Cancer Res Treat.* 115:289-296.

- Suzuki T, Darnel A.D, Akahira J.I., Ariga N, Ogawa S, Kaneko C, Takeyama J, Moriya T, Sasano H. 2001. 5 - reductases in human breast carcinoma: possible modulator of *in situ* androgenic actions, *J. Clin. Endocr. Metab.* 86:2250-2257.

- Suzuki T, Miki Y, Moriya T, Akahira J, Ishida T, Hirakawa H, Yamaguchi Y, Hayashi S y Sasano H. 2007. 5Alpha-reductase type 1 and aromatase in breast carcinoma as regulators of in situ androgen production. *Int. J. Cancer.* 120:285-291.

- Tan KA, Turner KJ, Saunders PT, Verhoeven G, De Gendt K, Atanassova N, Sharpe RM. 2005. Androgen regulation of stage-dependent cyclin D2 expression in Sertoli cells suggests a role in modulating androgen action on spermatogenesis. *Biol Reprod.* 72:1151-1160.

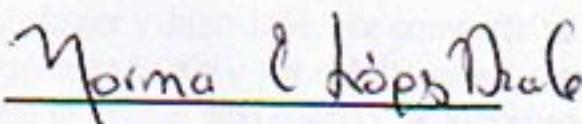
- Tashiro E, Tsuchiya A, Imoto M. 2007. Functions of cyclin D1 as an oncogene and regulation of cyclin D1 expression. *Jap Can Associ.* 7:629-635.

- Voigt KD, Bartsch W. 1986. Intratissular androgens in benign prostatic hyperplasia and prostatic cancer. *J Steroid Biochem.* 25:749-757.

- Weihua Z, Lathe R, Warner M, Gustafsson JA. 2002. An endocrine pathway in the prostate, ERbeta, AR, 5alpha-androstene-17beta-diol and CYP7B1 regulate prostate growth. *Proc Natl Acad Sci.* 99:13589-13594.
- WHO. World Health Organization. 2006. *The World Health Report*; WHO Publications. Geneva, Switzerland.
- Yu CP, Yu JC, Sun CA, Tzao C, Ho JY, Yen AM. 2008. Tumor susceptibility and prognosis of breast cancer associated with the G870A polymorphism of CCND1. *Breast Cancer Res Treat.* 107:95-102.
- Yuan X, Li T, Wang H, Zhang T, Barua M, Borgesi RA, Bublely GJ, Lu ML, Balk SP. 2006. Androgen receptor remains critical for cell cycle progression in androgen-independent CWR22 prostate cancer cells. *Am J Pathol.* 169:682-696.
- Zhou J, Ng S, Adesanya-Famuyiwa O, Anderson K, Bondy CA. 2000. Testosterone inhibits estrogen-induced mammary epithelial proliferation and suppresses estrogen receptor expression. *FASEB.*14: 1725-1730.

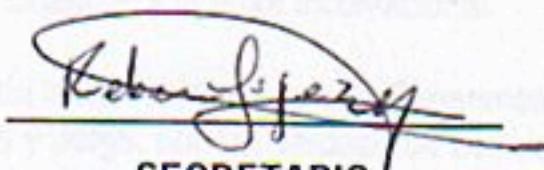
Los miembros del jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, abajo firmantes, aprobaron la tesis titulada: "**Efecto de los Androstandioles sobre la proliferación de células de cáncer de mama humano**". El examen de grado de Maestría se realizó el día 09 del mes de Septiembre del año 2010.

JURADO DE EXAMEN



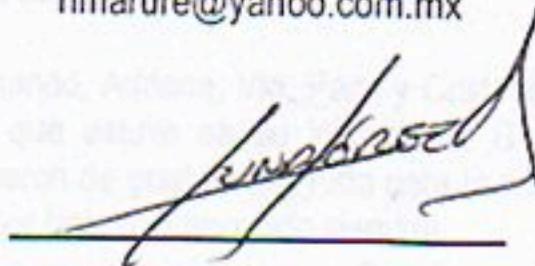
PRESIDENTE

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



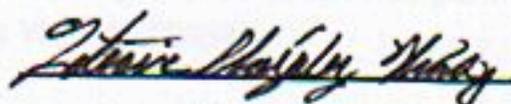
SECRETARIO

Dra. Rebeca López Marure
Departamento de Biología Celular del
Instituto Nacional de Cardiología, Ignacio Chávez.
rlmarure@yahoo.com.mx



VOCAL

Dr. Armando Luna López
Departamento de Investigación Básica
Instituto de Geriatria
allbioexp@yahoo.com



VOCAL

M. en BE. Leticia González Núñez
Departamento de Biología de la Reproducción
Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa
gnleti@yahoo.es