
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA



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

**EXPRESIÓN DE LOS ARNm QUE CODIFICAN PARA LAS ENZIMAS QUE
BIOTRANSFORMAN A LA TESTOSTERONA EN CÉLULAS HUMANAS DE
CARCINOMA MAMARIO**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

PRESENTA:
BIOL. EXP. LETICIA GONZÁLEZ NÚÑEZ

CODIRECTORES:

DRA. ANA ELENA LEMUS BRAVO
DR. PABLO GUSTAVO DAMIÁN MATZUMURA

ASESOR:
DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA

México D. F., diciembre 2007.

Este trabajo fue realizado en los departamentos de Biología de la Reproducción del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán y de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.

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

La Maestría en Biología Experimental fue apoyada por la beca otorgada durante el período 2003-2004 por parte de CONACyT con el No. de registro 176192.

COMITÉ TUTORAL

CODIRECTORA

Dra. Ana Elena Lemus Bravo

Profesora Titular

Departamento de Biología de la Reproducción
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa
anaelenalemus@prodigy.net.mx

CODIRECTOR

Dr. Pablo Gustavo Damián Matzumura

Profesor Titular

Departamento de Biología de la Reproducción
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa
pgdm@xanum.uam.mx

ASESOR

Dr. Alejandro Zentella Dehesa

Investigador Titular

Departamento de Bioquímica
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y
Nutrición Salvador Zubirán

Los miembros del jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, abajo firmantes, aprobaron la tesis titulada: **“EXPRESIÓN DE LOS ARNm QUE CODIFICAN PARA LAS ENZIMAS QUE BIOTRANSFORMAN A LA TESTOSTERONA EN CÉLULAS HUMANAS DE CARCINOMA MAMARIO”**

JURADO DE EXAMEN

Presidenta

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

Vocal

DRA. MARCELA ARTEAGA SILVA
Departamento de Biología de la Reproducción
División de Ciencias Biológicas y de la Salud. UAM-I.

Vocal

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

Secretaria

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

AGRADECIMIENTOS

Con Amor y agradecimiento a mis padres, **Lore y José**, quienes con su amor, apoyo y consejos me han guiado y procurado lo mejor para mí y por animarme a salir adelante ante cualquier adversidad. ¡¡Muchas Gracias!!!

A mi hermano: **Sergio** por su apoyo y hacerme reír cuando estoy triste, por ser mi confidente y amigo, sabes que es reciproco.

A mis hermanas **Reyna, Susana y Eli** por mostrarme siempre su cariño incondicional. ¡¡Las quiero!!

A **Irma** y su familia: **Salvador, Chavita, Daniel y Rodrigo**, por su apoyo y cariño, me enseñan cada día que lo importante que es estar unidos.

A **Guillermin** por su apoyo total. Gracias.

Gracias a mi amiga de siempre: **Angelitos**, por escucharme y darme consejos, por apoyarme incondicionalmente. ¡Gracias!

Al **Dr. Pablo** por su amistad, confianza y apoyo en todo momento, por el conocimiento que día a día recibo de usted. ¡Mil Gracias por todo!

A los colegas del laboratorio: **Erika, Alice, Karina, Javier Esteban, Carlos, Alejandro, Roxana y Ricardo**. Gracias por su amistad y apoyo; y por compartir conmigo sus conocimientos y experiencias.

A mi amigo y colega **Armando** por sus pláticas y su ayuda.

A mis colegas **Hilda, Argelia, Haydee** por estar siempre conmigo y ahí vamos.

A mi amigos **Griselda, Tomy, Luz, Maribel y Sergio** por su apoyo incondicional.

A la **Dra. Ana Elena Lemus Bravo** por cada enseñanza recibida durante la realización del mismo y por el tiempo brindado para ayudarme.

A **Rene** por su apoyo para la realización del trabajo.

Al **Dr. Alejandro Zentella Dehesa** por sus consejos y comentarios al trabajo realizado.

Un agradecimiento al **Dr. Fernando Larrea Gallo**, Jefe del Departamento de Biología de la Reproducción, del INCMNSZ, por las facilidades y el apoyo brindado para el desarrollo de este trabajo.

Un sincero agradecimiento a los miembros del Jurado: **Dra. Minerva Muñoz Gutiérrez, Dra. Mina Königsberg Fainstein, Dra. Marcela Arteaga Silva y Dra. Edith Lucia Salazar Esquivel** por los valiosos comentarios y por el tiempo que dedicaron a la revisión de este escrito.

A todas las personas que de alguna forma me han ayudado a lo largo de mi vida y de mi camino.

“Es de a poco como se alcanza objetivos, metas y retos, es con sabiduría y consejo como se abre el camino al éxito y sobretodo, es con la mejor motivación con la que se debe llegar al triunfo, porque en ella habremos facilitado el camino para otros, deseando que también lleguen a la VICTORIA....”

ÍNDICE.	
Resumen.....	1
Abstract.....	4
1. Introducción.....	6
2. Antecedentes.....	12
3. Justificación.....	21
4. Objetivos.....	22
4.1. General y Particulares.....	22
5. Hipótesis.....	23
6. Materiales y Métodos.....	24
6.1. Material biológico.....	24
6.2. Material radiactivo.....	24
6.3. Esteroides radioinertes.....	25
6.4. Medio de cultivo celular.....	25
6.5. Cultivo de las líneas celulares MCF-7, MDA-MB 231 y HeLa.....	25
6.6. Estudios de metabolismo <i>in vitro</i> de T-[¹⁴ C].....	26
6.6.1. Incubación de las células con T-[¹⁴ C].....	26
6.6.2. Extracción de los Metabolitos formados durante la incubación.....	27
6.6.3. Análisis de los Metabolitos de la T por la técnica de Dilución Isotópica Inversa.....	27
6.7. Análisis de la expresión de los ARNm que codifican para las enzimas que biotransforman a la T.....	29
6.7.1. Extracción del ARN por la técnica de isotiocianato de guanidina.....	29
6.7.2. Análisis de los ARNm en electroforesis en geles de agarosa en condiciones desnaturalizantes.....	30
6.7.3. Análisis de la expresión de las enzimas a través de sus ARNm.....	30
6.7.4. Análisis estadístico.....	33
7. Resultados.....	35

7.1. Formación <i>in vitro</i> de metabolitos 5 α -reducidos de T-[¹⁴ C] en las células MCF-7, MDA-MB 231 y HeLa.....	35
7.2. Cinética del metabolismo de la T-[¹⁴ C] en las líneas celulares MCF-7,MDA-MB 231 y HeLa con respecto a la concentración de sustrato.....	42
7.2.1. Cinética del metabolismo de la T-[¹⁴ C] en la línea celular MCF-7.	42
7.2.2. Cinética del metabolismo de la T-[¹⁴ C] en la línea celular MDA-MB 231.....	44
7.2.3. Cinética del metabolismo de la T-[¹⁴ C] en la línea celular HeLa...	45
7.3. Formación de metabolitos 5 α -reducidos de la T en las líneas celulares MCF-7, MDA-MB 231 y HeLa.....	46
7.4. Efecto de la inhibición de las enzimas 5 α -esteroide reductasas (tipos 1 y 2) sobre el metabolismo de la T-[¹⁴ C] en la línea celular MCF-7.....	47
7.5. Expresión de la enzimas que participan en el metabolismo de la T en las líneas celulares de carcinoma mamario.....	50
8. Discusión y Conclusiones.....	52
9. Perspectivas.....	57
10. Bibliografía.....	58
11. Anexo.....	67

ABREVIATURAS.

Δ^4 -A	Delta 4-androstendiona
3 α ,5 α -Adiol	3 α ,5 α -Androstandiol
3 β ,5 α -Adiol	3 β ,5 α -Androstandiol
3 β -HEDasa	20 α (3 α)-hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 1
3 α -HEDasa	3 α -hidroxiesteroide deshidrogenada tipo3
5 α -ERasa	5 α -esteroide reductasas: 5 α -ERasa1 y 5 α -ERasa2
5 α -ERasa1	5 α -esteroide reductasa tipo 1
5 α -ERasa2	5 α -esteroide reductasa tipo 2
5 α -A	5 α -Androstandiona
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
AKR	Aldo Keto Reductases
AKR1C1	gen de la 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa
AKR1C2	gen de la 3 α -hidroxiesteroide deshidrogenasa
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
DHT	5 α -Dihidrotestosterona
Dioles	Androstandioles: 3 α ,5 α -Adiol y 3 β ,5 α -Adiol
DMEM	Medio Eagle modificado por Dubelcco
dNTP's	desoxinucleótidos trifosfato (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
E ₂	Estradiol
EtOAc	Acetato de etilo
F	Finasteride
FMF	Solución desnaturalizante para ARN integrada por formamida 50%, MOPS 1X y formaldehído 7%
G3PDH	Gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa
H ₂ O-DEPC	H ₂ O tratada con dietilpirocarbonato
MOPS	Ácido 3-[N-Morfolino] propranosulfónico
P ₄	Progesterona
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
RA (AR)	Receptor de andrógenos; androgen receptor
RE (ER)	Receptores de estrógenos; estrogen receptor
RE α	Receptor de estrógenos alfa
RE β	Receptor de estrógenos beta
RNasa H	Enzima que remueve los ARN existentes
RNasaOUT [®]	Inhibidor de ribonucleasas
RP	Receptor de progesterona
RT	Retrotranscripción
SBF	Suero de bovino fetal inactivado por calor
SBF-C	SFB previamente inactivado por calor y tratado con una suspensión de carbón activado y dextran T-70, para adsorber los esteroides endógenos del suero.
SRD5A1	gen de la 5 α -esteroide reductasa tipo 1
SRD5A2	gen de la 5 α -esteroide reductasa tipo 2
T	Testosterona
T-[¹⁴ C]	Testosterona 4-[¹⁴ C]
TBE	Solución amortiguadora para ADN compuesta por Tris Base 10 mM, ácido bórico 10 mM y EDTA 10 mM

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS.

Figura 1.	Distribución porcentual de las principales causas de defunción por tumores malignos en la mujer mexicana.	7
Figura 2.	Relación del número de defunciones y tasa de mortalidad debido al cáncer mamario en mujeres mexicanas.	8
Figura 3.	Número de defunciones (barras) debido al cáncer mamario y tasa específica de mortalidad (línea) por rango de edad en el año 2000 (PRONASA, 2006).	9
Figura 4.	Aumento en las tasas de incidencia y mortalidad del cáncer de mama femenino, en México, con respecto a la edad (GLOBOCAN, 2002).	10
Figura 5.	Biotransformación de T a sus metabolitos tetrahidroreducidos.	19
Figura 6.	Perfil cromatográfico representativo de los controles experimentales con incubaciones realizadas solo con T-[¹⁴ C].	35
Figura 7.	Perfil cromatográfico representativo de los extractos orgánicos de células MCF-7, después de la incubación con T-[¹⁴ C].	37
Figura 8.	Perfil cromatográfico representativo de los extractos orgánicos de células MDA-MB 231, después de la incubación con T-[¹⁴ C].	39
Figura 9.	Perfil cromatográfico representativo de los extractos orgánicos de células HeLa, después de la incubación con T-[¹⁴ C].	40
Figura 10.	Bioconversión de T-[¹⁴ C] a metabolitos no-fenólicos en células MCF-7, en función de la concentración de sustrato, durante 2 horas.	43
Figura 11.	Bioconversión de T-[¹⁴ C] a metabolitos no-fenólicos en células MDA-MB 231, en función de la concentración de sustrato, durante 2 horas.	44
Figura 12.	Bioconversión de T-[¹⁴ C] a metabolitos no-fenólicos en células HeLa, en función de la concentración de sustrato, durante 2 horas.	45
Figura 13.	Formación de metabolitos 5 α -reducidos de T en células MCF-7, MDA-MB 231 y HeLa, en función del tiempo.	46
Figura 14.	Metabolismo de la T-[¹⁴ C] en las células MCF-7 en ausencia o presencia de 1 mM de Finasteride, inhibidor competitivo de las enzimas 5 α -ERasas.	49
Figura 15.	Niveles de expresión de los genes SRD5A1, SRD5A2, AKR1C1 y AKR1C2 en células MCF-7 y MDA-MB 231 por medio del ARNm.	51
Tabla 1.	Aumento en las probabilidades de desarrollar cáncer de mama con respecto a la edad de la mujer, de acuerdo a la Asociación Estadounidense del Cáncer entre los años 2000-2001 (Clínica Mayo, 2002).	10
Tabla 2.	Secuencias de los oligonucleótidos utilizados amplificar el ARNm que codifica para las enzimas que biotransforman a la T a sus metabolitos: 5 α -ERasa1, la 5 α -ERasa2, la 3 α -HEDasa y la 3 β -HEDasa.	32
Tabla 3.	Pureza radioquímica de los metabolitos aislados después de la incubación <i>in vitro</i> con T-[¹⁴ C] en células MCF-7. Determinada a través de recristalizaciones sucesivas de las fracciones cromatográficas.	38

RESUMEN.

El cáncer de mama es una neoplasia dependiente de hormonas esteroides sexuales, en la cual los estrógenos juegan un papel relevante en su origen y progresión; sin embargo, la participación de los andrógenos aún es motivo de controversia, ya que los resultados de numerosos estudios realizados en modelos animales demuestran que los andrógenos pueden promover tanto efectos de tipo estimulador como inhibitorio sobre el cáncer de mama. Indicando que el efecto inhibitorio inicial, observado después de su administración, estimula posteriormente la proliferación celular.

Se ha demostrado plenamente la presencia de andrógenos y de su receptor, tanto en tejido mamario normal como canceroso, así como su biotransformación a estrógenos; sin embargo, la administración de inhibidores de la actividad de la enzima aromatasa en la terapia del cáncer de mama no es capaz de inhibir totalmente la presencia de actividad estrogénica, lo cual podría explicarse por la formación de metabolitos no aromáticos de testosterona (T), los cuales, como ha sido bien demostrado en diversos órganos blanco, son capaces de interactuar con los subtipos del receptor de estrógenos (RE) alfa ($RE\alpha$) y beta ($RE\beta$) intracelulares e inducir efectos de tipo estrogénico.

Con la finalidad de determinar la capacidad enzimática de las células de carcinoma mamario para biotransformar T en metabolitos $3\alpha,5\alpha$ -Androstandiol ($3\alpha,5\alpha$ -Adiol) y $3\beta,5\alpha$ -Androstandiol ($3\beta,5\alpha$ -Adiol), se estudió el metabolismo de T isotópicamente marcada con ^{14}C (T- ^{14}C) en cultivos de células de cáncer de mama humano dependiente de estrógenos (MCF-7), de células de cáncer de mama humano no dependientes de estrógenos (MDA-MB 231) y células de carcinoma cérvico-uterino no dependiente de estrógenos (HeLa) a diferentes concentraciones de sustrato y tiempos de incubación. Los metabolitos formados se identificaron y cuantificaron con la técnica de dilución isotópica inversa, que incluyó cromatografía en placa fina de los extractos orgánicos, en diferentes sistemas de disolventes y recristalizaciones sucesivas de las zonas radiactivas

aisladas, hasta la obtención de actividad específica constante. Posteriormente, se estudió en las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB 231, la expresión génica de las enzimas 5α -esteroide reductasa tipo 1 (5α -ERasa1) y tipo 2 (5α -ERasa2), así como de la 3α -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3α -HEDasa) y de la 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3β -HEDasa), todas estas requeridas para reducir el anillo A de la molécula de T y permitir la formación tanto del $3\alpha,5\alpha$ -Adiol como del $3\beta,5\alpha$ -Adiol.

Los resultados obtenidos en la presente tesis demostraron un patrón distintivo del metabolismo de T en las células MCF-7, caracterizado por una abundante conversión (48.3%) en androstandioles (Dioles; $3\alpha,5\alpha$ -Adiol y $3\beta,5\alpha$ - $3\beta,5\alpha$ -Adiol), observándose a tiempos cortos (30-60 minutos) la formación de 5α -dihidrotestosterona (DHT), producto intermediario obligatorio para la biosíntesis de Dioles. Esto se demostró con la incubación de T en células MCF-7, en presencia de Finasteride (F), un inhibidor competitivo de las 5α -esteroide reductasas (5α -ERasas), que resultó en una disminución significativa en la formación de DHT y, en consecuencia, la de los Dioles. La bioconversión de T en Dioles en las células MCF-7 fue dependiente tanto de la concentración del sustrato, como del tiempo de incubación. En contraste con los resultados obtenidos en las células MCF-7, en las células MDA-MB 231 se observó una muy limitada bioconversión de T a sus metabolitos 5α -reducidos, mientras que las células HeLa fueron incapaces de formar Dioles, aún a los tiempos de incubación más prolongados.

Los resultados de la expresión génica de las enzimas demostraron que la expresión del ARNm que codifica a la 5α -ERasa1 (gen: SRD5A1) en las células MCF-7 fue 1.5 veces mayor que en las células MDA-MB 231, sin embargo, la expresión del ARNm de 3α -HEDasa (gen: AKR1C2), y del ARNm de la 3β -HEDasa (gen: AKR1C1) en ambas líneas celulares, no mostró diferencias significativas ($p>0.05$).

El análisis integral de los resultados obtenidos demuestra que la gran formación de Diones, a partir de T, en las células MCF-7 es el efecto de la potente actividad de las 5α -ERasa1 y de su vinculada sobre expresión del ARNm, con el objeto de iniciar un proceso celular intrínseco para la formación de los metabolitos no fenólicos que podrían activar la proliferación celular, explicándose así el controvertido efecto de la T en la progresión del cáncer mamario humano.

ABSTRACT.

Breast cancer is a sex hormone-dependent neoplasia. It has clearly been shown that estrogens play an important role on its origin and progression. However, the involvement of androgens has remained controversial, since numerous studies in animal models show that androgens can induce both stimulatory and inhibitory effects on breast cancer cell growth or that initial inhibitory effects are followed by an increase on cell proliferation. Even it has been demonstrated that the presence of androgens and their receptor in both normal and cancer tissues, as well as their biotransformation to estrogens, the administration of aromatase enzyme inhibitors used in breast cancer therapies cannot fully preclude the estrogenic activity, a phenomena that can be partially explained by the production of non-aromatic metabolites of testosterone (T), which have been shown to interact to both subtypes of the estrogen receptor (ER) alpha ($ER\alpha$) and beta ($ER\beta$) and exerting estrogenic-like effects.

With the aim to determine the enzymatic potential of carcinoma cell lines to biotransform T into tetrahydro-reduced metabolites of T, androstanediols (Diols): $3\alpha,5\alpha$ -Androstanediol ($3\alpha,5\alpha$ -Adiol) and $3\beta,5\alpha$ -Androstanediol ($3\beta,5\alpha$ -Adiol), the present study studied the metabolism of [^{14}C] T in breast cancer, estrogen-dependent cells (MCF-7), breast cancer, non-estrogen-dependent cells (MDA-MB 231) and non-estrogen-dependent, uterine carcinoma cell line (HeLa) at different substrate concentrations and time incubation periods.

T metabolites were identified and quantified by a reverse isotope dilution technique, which included thin layer chromatography of organic extracts in different solvent systems and successive recrystallizations of radioactive zones up to obtain a constant specific activity. On the other hand, gene expression of A-ring testosterone reducing enzymes were measured on MCF-7 and MDA-MB-231 cells, including human steroid 5-alpha-reductase type-1 (5α -SRase1), type 2 (5α -SRase2), 3-alpha hydroxysteroid dehydrogenase (3α -HDase) and 3-beta hydroxysteroid dehydrogenase (3β -HDase).

Results demonstrated that a distinctive pattern of T metabolism was identified in MCF-7 cells, characterized by the abundant bioconversion to androstane diols (48.3%), with the preceding formation of 5-alpha-dihydrotestosterone (DHT), as obligate intermediary. Cell incubation in the presence of Finasteride (F), a competitive inhibitor of 5-alpha-reductases enzymes (5α -SRases), abolished drastically DHT and, consequently, Diols formation. There were both a substrate concentration and a time dependent biotransformation of T to $3\alpha,5\alpha$ -Adiol and $3\beta,5\alpha$ -Adiol metabolites.

Opposite to the results obtained in MCF-7 cells, the MDA-MB 231 cell line presented a limited T metabolism to its 5-alpha-reduced metabolites, whereas HeLa cells were unable at all to produce Diols, even at the longest incubation periods of time studied.

Gene expression experiments showed that MCF-7 cell presented higher (1.5-fold) 5α -SRase1-mRNA synthesis (gen: SRD5A1) compared to MDA-MB 231 cells; nevertheless, 3α -HDase-mRNA (gen: AKR1C2) and 3β -HDase-mRNA (gen: AKR1C1) expression levels were similar in both cell lines, with no statistic differences ($p>0.05$).

The overall results demonstrated that MCF-7 cells exhibit enhanced expression and activity of androgen-metabolizing enzymes, particularly the 5α -SRase1 enzyme, leading to rapid and large Diols formation. These data suggest that Diols formation could somewhat explain the debate of the paradoxical effects of T on human breast cancer cell progression.

1. INTRODUCCIÓN.

El cáncer mamario es, sin duda alguna, uno de los principales problemas que impacta sobre la salud de las mujeres tanto en países desarrollados como en desarrollo (Ferlay *et al.*, 2000). Se estima que cada año se diagnostican alrededor de 1.1 millones de casos nuevos en el mundo, lo que representa el 10% de todos los casos nuevos de cáncer de mama y más de 502,000 mujeres murieron por esta causa en el año 2005, es decir el 1.6% del total de las muertes femeninas en todo el mundo (WHO, 2007).

En México, el cáncer de mama es la segunda causa de muerte en el grupo de mujeres mayores de 25 años superada solamente por el cáncer cérvico-uterino (figura 1; INEGI, 2007); sin embargo, la tasa de incidencia anual del cáncer de mama es muy superior al cervical, el cual se ha reducido en el país a un ritmo de casi 5% por año a partir de 1998, razón por la cual el número de muertes por cáncer de mama ha igualado la cifra correspondiente a las muertes por cáncer cervical y se prevé que en los próximos cinco años asumirá plenamente su posición como el cáncer más frecuente entre las mujeres mexicanas. De hecho, la mortalidad a causa del cáncer de mama en diferentes regiones del país (Baja California, DF, Nuevo León y Chihuahua) sobrepasa el número de casos de cáncer cervical (Salud, México 2004).

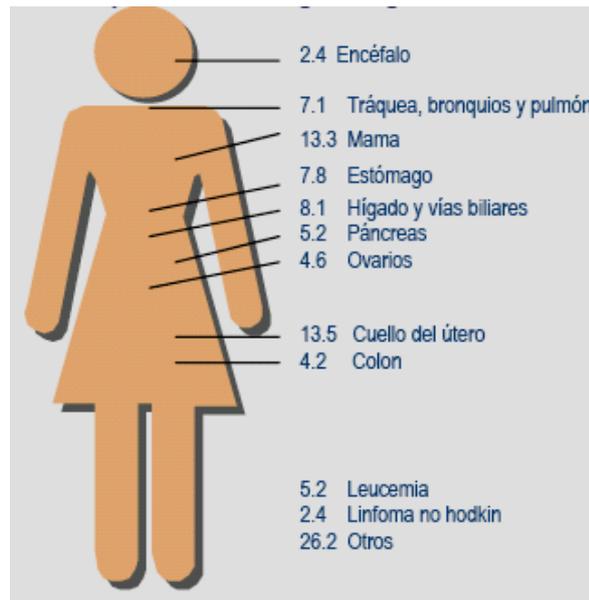


Figura 1. Distribución porcentual de las principales causas de defunción por tumores malignos en la mujer mexicana. La tasa de mortalidad por cáncer de mama es de 13.3 por cada 100,000 mujeres de 25 años de edad o más, constituyendo la segunda causa por muerte oncológica, siendo superada por la tasa de mortalidad por cáncer de cuello de útero (INEGI, 2007).

La incidencia del cáncer de mama en mujeres mexicanas se considera baja en comparación con otros países de América Latina (Uruguay 46%, Argentina 34%, Brasil 27%, Venezuela 29%, Paraguay 25%, Perú 22%, México 18% del total de nuevos casos relacionados con otros tipos de cáncer), sin embargo, el incremento real en el número de defunciones en México fue muy alto en el período 1990-2000, alcanzando el 56.1% de fallecimientos con respecto al número total de casos registrados de cáncer de mama (ICAR, 2002). Estos datos pueden ser más alarmantes si se toma en cuenta que en el año 2000 había 23.9 millones de mujeres mayores de 25 años y que para el año 2020 este grupo alcanzará los 38.8 millones de mujeres que pueden desarrollar cáncer de mama (CONAPO, 2007).

Como se observa en la figura 2, en México, durante la década pasada (1990-2000) aumentó sustancialmente el número de defunciones por cáncer de mama (PRONASA, 2006; PACMSS, 2002). De acuerdo con los últimos reportes del Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI, 2007), la tasa de mortalidad por cáncer de mama en el año 2005 alcanzó los 13.3 por cada

100,000 mujeres de 25 años de edad o más, lo que se traduce en que se registren en México alrededor de 10 muertes diarias por esta causa.

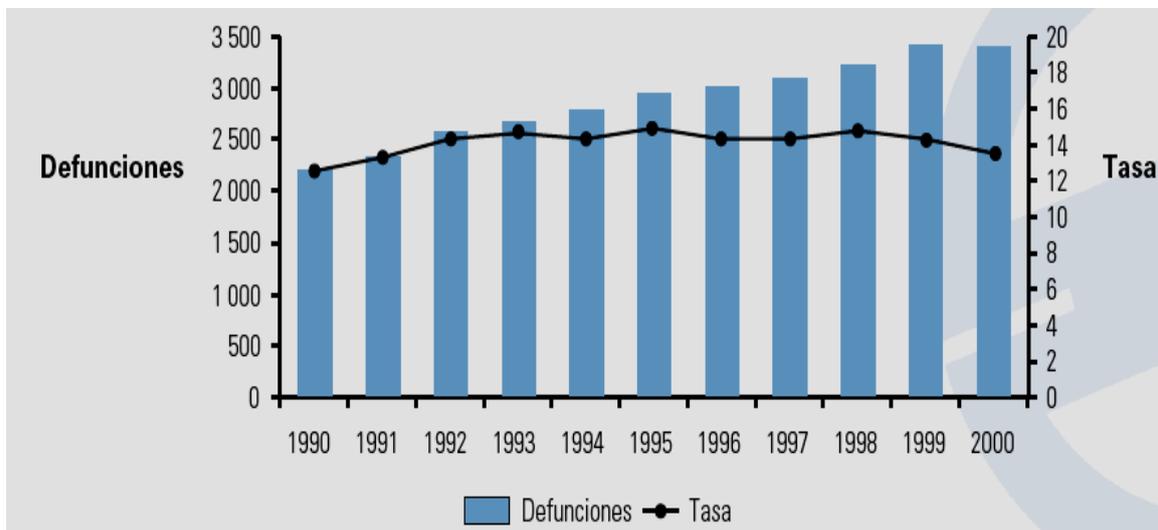


Figura 2. Relación del número de defunciones y tasa de mortalidad debido al cáncer mamario en mujeres mexicanas. El número de defunciones (barras) se incremento en el año 1999 hasta casi 3500 muertes por cáncer de mama, mientras que la tasa de mortalidad (línea) disminuyó hacia el año 2000 a <14 por cada 100,000 mujeres de 25 años y más (PRONASA, 2006).

No todos los datos son desalentadores, desde el sexenio 1994-2000, con la creación del Programa Nacional de la Mujer, se han intensificado las campañas de detección y tratamiento del cáncer de mamá, realizando un número importante de mastografías, dando la atención médica y hospitalaria a los casos que así lo requirieron, teniendo como objetivo prevenir la enfermedad (PROMSA, 2006; SS, 2006); sin embargo, estos esfuerzos no han sido suficientes para controlar esta enfermedad y es imperativo realizar investigaciones que permitan detectar oportunamente el cáncer de mama.

El notable incremento en la prevalencia e incidencia de cáncer mamario se ha asociado al impacto de diversos factores de riesgo, los cuales se relacionan cada vez más con estilos de vida contemporáneos (Berardo *et al.*, 1996). Dentro de los factores de riesgo se encuentran los asociados a la vida reproductiva de la mujer, los cuales pueden presentar un papel determinante en el desarrollo y progresión del cáncer de mama; entre estos se incluyen la menarquia temprana,

la menopausia tardía (Kelsey *et al.*, 1993), la nuliparidad, la edad tardía del nacimiento del primer hijo/a. Además, se suman otros factores hormonales externos como la administración de estrógenos y progestinas sintéticas en formulaciones anticonceptivas, en las terapias de reemplazo hormonal utilizadas en el climaterio y para la condición postmenopáusica (López-Ríos *et al.*, 1997), el consumo de fitoestrógenos y los xenoestrógenos presentes en alimentos y suplementos alimenticios (Safe, 1995). Es probable que todos estos agentes, junto a los factores genéticos y la edad de la mujer, contribuyan en aumentar el riesgo de desarrollar el cáncer de mama.

La incidencia de esta neoplasia maligna es muy rara antes de los 20 años, pero en mujeres mayores de 25 años crece la probabilidad de desarrollarla hasta alcanzar su máximo alrededor de la menopausia (Salud, 2004), siendo en nuestro país la edad media de los fallecimientos por esta causa de 56 años y la mayor proporción de muertes por cáncer de mama ocurre entre los 45 y los 55 años (figuras 3 y 4).

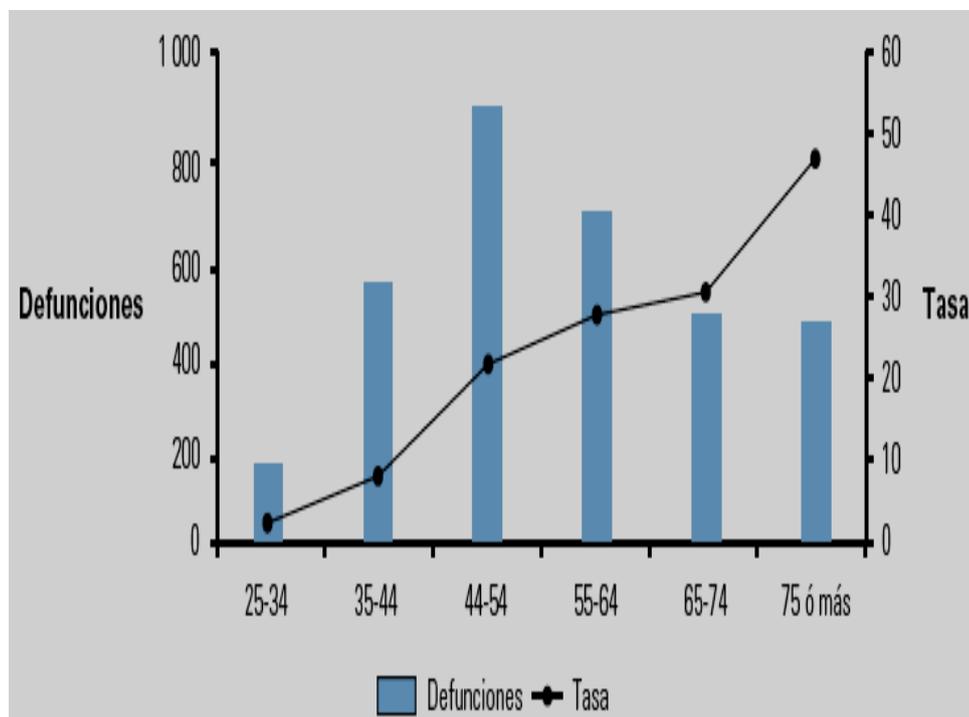


Figura 3. Número de defunciones (barras) debido al cáncer mamario y tasa específica de mortalidad (línea) por rango de edad en el año 2000 (PRONASA, 2006).

De acuerdo a la tabla 1, los reportes de la Clínica Mayo señalan que las probabilidades de desarrollar cáncer de mama aumentan con la edad de la mujer.

Tabla 1. Aumento en las probabilidades de desarrollar cáncer de mama con respecto a la edad de la mujer, de acuerdo a la Asociación Estadounidense del Cáncer entre los años 2000-2001 (Clínica Mayo, 2002).

Rango de edad (años)	Probabilidad de desarrollar cáncer de mama
21 a 30	1 de cada 2,525
31 a 40	1 de cada 217
41 a 50	1 de cada 50
51 a 60	1 de cada 24
61 a 70	1 de cada 14
Más de 70	1 de cada 10

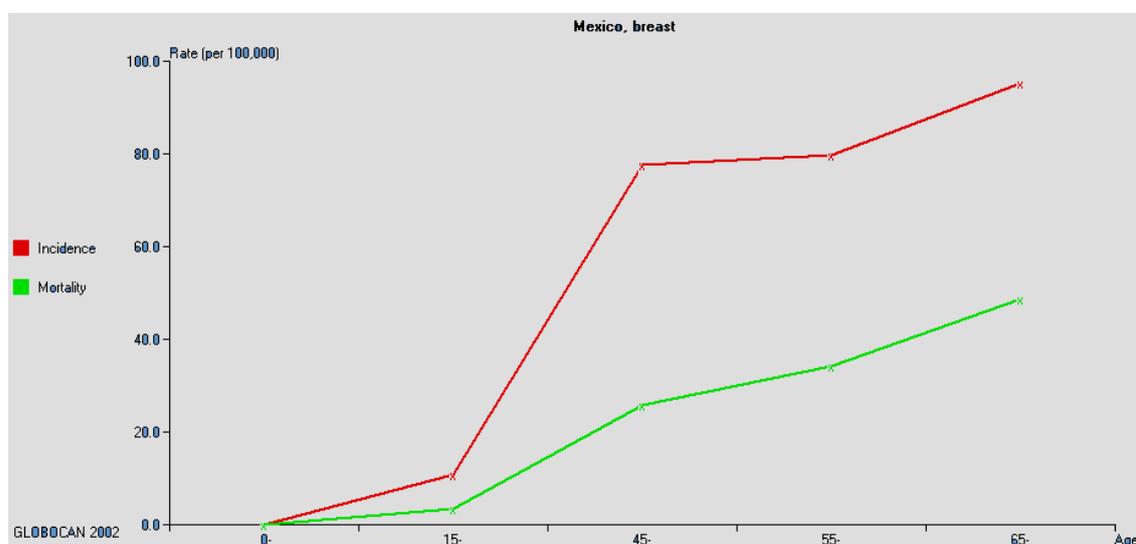


Figura 4. Aumento en las tasas de incidencia y mortalidad del cáncer de mama femenino, en México, con respecto a la edad (GLOBOCAN, 2002).

Si bien la edad constituye un factor de alto riesgo, éste aumenta cuando se combina con el uso de hormonas esteroides sexuales, como los estrógenos y la progesterona (P_4), las cuales juegan un papel determinante en el origen y

progresión del cáncer de mama (Pike y Spicer, 1991). Es indudable que las hormonas esteroideas sexuales juegan un papel en el desarrollo del cáncer, pero la relación precisa entre hormonas endógenas y exógenas con el desarrollo de la neoplasia aún es controversial.

2. ANTECEDENTES.

2.1. Papel de las hormonas en la progresión del cáncer de mama.

Los estrógenos son las hormonas ováricas más importantes en términos de sus capacidades morfogénicas y mitogénicas, estos son secretados en bajas concentraciones (picomolares). Por otro lado, los andrógenos son secretados tanto por los ovarios como por las glándulas suprarrenales; circulan en concentraciones similares al estradiol (E_2) durante el período preovulatorio y en altas concentraciones durante el resto del ciclo menstrual. Después de la menopausia, la secreción de estrógenos disminuye dramáticamente, pero los andrógenos son secretados en concentraciones aún mayores con respecto al período fértil de la mujer (Honma *et al.*, 2006).

Después de la menopausia, las células de la glándula mamaria deben adaptarse, y proliferar en ambientes con baja concentración de estrógenos, por lo que deben de incrementar su capacidad de sintetizar dicha hormona en forma local, así como aumentar su capacidad de respuesta a los mismos. Estos cambios pueden incluir las siguientes acciones: a) aumentar la expresión de la enzima aromatasa (la cual biotransforma andrógenos en estrógenos), b) aumentar la expresión de los subtipos del RE intracelulares y de los coactivadores que intervienen en la activación transcripcional de genes dependientes de estrógenos involucrados en la proliferación celular o, c) utilizar los metabolitos de los andrógenos que puedan interactuar con el RE y promover efectos de tipo estrogénico (Clemons y Goss, 2001; Kurebayashi, 2003; Yager y Davison, 2006; Shang, 2006). Las adaptaciones que presenten las células normales del epitelio mamario, les permitirían tener la capacidad de proliferar en ambientes con baja concentración de estrógenos, pero también podrían explicar, al menos parcialmente, la dependencia hormonal del origen y proliferación del cáncer de mama.

2.2. Papel de los andrógenos en la progresión del cáncer de mama.

La participación precisa de los andrógenos sobre el cáncer de mama permanece controversial. Se han acumulado evidencias que indican que los andrógenos pueden actuar como agentes hormonales estimulatorios o inhibitorios, aunque los mecanismos por los cuales se ejercen estos efectos no han sido completamente estudiados. En primer lugar, se han descrito los efectos inhibitorios, en donde la T interactúa con el receptor de andrógenos (RA) intracelular, llevando a cabo un efecto andrógeno para detener la proliferación de las células de cáncer mamario (Poulin *et al.*, 1988; Jorgensen *et al.*, 1997; Szelei *et al.* 1997; Adams, 1998; Labrie *et al.*, 2003; Greeve *et al.*, 2004; Somboonporn y Davis, 2005). Lo cual se relaciona con la expresión de RA en una gran proporción de carcinomas mamaros, pues ha sido encontrado en un 54% en pacientes premenopáusicas y en un 48% en pacientes posmenopáusicas; así como la expresión del RA en la línea celular MCF-7 (Horwitz *et al.*, 1975). Otros reportes indican, que la administración de andrógenos resulta en la regresión de tumores de cáncer inducidos hormonal o químicamente (Zhou *et al.*, 2000). Algunas observaciones sugieren que la adición de T en la terapia de reemplazo hormonal convencional para mujeres con postmenopausia puede disminuir el riesgo de cáncer de mama (Dimitrakakis *et al.*, 2004).

El Dr. Poulin en 1988 en Canada, demostró en estudios *in vitro*, el efecto inhibitorio marcado en la proliferación de células de cáncer mamario dependientes de estrógeno (línea celular ZR-75-1) mediante la administración de otro andrógeno más potente que la T, no aromatizable, conocido como DHT (Poulin *et al.*, 1988).

En segundo lugar, los andrógenos pueden actuar como agentes hormonales que estimulan la proliferación de las células de cáncer mamario humano. Los andrógenos pueden ser formados *in situ* en la glándula mamaria a partir de precursores de la corteza suprarrenal y se consideran relevantes por su

participación en la progresión del cáncer mamario, particularmente en la mujer postmenopáusica (Pasqualini, 1993).

Numerosos estudios en modelos animales han demostrado que los andrógenos, a concentraciones fisiológicas, estimulan el desarrollo del cáncer mamario (Liao *et al.*, 1998; Xie *et al.*, 1999; Liao y Dickson, 2002; Somboonporn y Davis, 2005). Los andrógenos pueden estimular la proliferación de células de cáncer de mama (Hackenberg *et al.* 1993, Aspinall *et al.* 2004). En particular la T y la DHT tienen un efecto estimulador en la proliferación de la línea celular de cáncer mamario MCF-7, en presencia ó ausencia de E₂ (Labrie *et al.*, 1998).

Como una posible explicación del papel controversial de los andrógenos se ha propuesto que su presencia en tejido maligno sumado con la conversión a estrógenos mediadas por la enzima aromatasa en mujeres pre- y postmenopáusicas, pudiera ser importante para la estimulación de la progresión del carcinoma mamario (Pasqualini *et al.*, 1996), Aunque la aromatización de andrógenos en células de cáncer de mama ha permanecido controversial, la actividad de la aromatasa es baja pero suficiente para producir estrógenos en células de carcinoma mamario humano dependientes de estrógenos MCF-7 (Sonne-Hansen y Lykkesfeldt, 2005). De hecho para detener la formación de estrógenos, han sido utilizados ampliamente varios inhibidores de la aromatasa en esquemas terapéuticos en cáncer de mama (Coombes *et al.*, 1987; Santen *et al.*, 1990; Demers, 1994; Goss, 1999; Ragaz, 1999; Sasano *et al.*, 1999), aún cuando los efectos de tipo estrogénico de los andrógenos no son completamente suprimidos por este tratamiento (Brodie *et al.*, 1977; Brodie y Longcope, 1980; Coombes *et al.*, 1984; Wing *et al.*, 1985; Lippman, 1998; Buzdar, 2002; Lonning, 2004; Brueggemeier *et al.*, 2005).

Otra posible explicación es la participación de DHT, un andrógeno con alta afinidad por el RA y baja afinidad al RE (Rocheftort y García, 1984), el cual puede tener actividad anti-estrogénica a niveles fisiológicos en diferentes sistemas *in vitro* (líneas celulares de cáncer de mama MCF-7, T47-D, ZR 75-1 y MDA-MB

231) e *in vivo* a través de su interacción con el RA (Poulin *et al.*, 1988; Birrell *et al.*, 1995; Hackenberg *et al.*, 1993). Aunque la DHT, en concentraciones fisiológicas, estimula la proliferación de células MCF-7 y de células MDA-MB 453, se sugiere que puede ser debido a la activación de vías independientes del RA por metabolitos activos con actividad de tipo estrogénica (Birrell *et al.*, 1995; Hall *et al.*, 1994).

2.3. Metabolismo de andrógenos y el cáncer de mama.

Estas observaciones han llevado a analizar los cambios en la capacidad enzimática de las células de carcinoma mamario para biotransformar andrógenos en metabolitos con actividad de tipo estrogénica.

Debido a que la estructura de la molécula de T y de DHT, específicamente el anillo A del esteroide, es idéntica al de las estructuras de las moléculas de las progestinas sintéticas, es necesario tomar en cuenta una serie de estudios experimentales en los que demostraron que diversas progestinas sintéticas derivadas de la 19-nortestosterona, ampliamente utilizadas en formulaciones hormonales anticonceptivas, pueden inducir el crecimiento y la proliferación de células derivadas de cáncer mamario mantenidas en cultivo (Van der Burg *et al.*, 1992). Este efecto se observó en líneas celulares que expresan RE (MCF-7 y T47-D) (Schoonen *et al.*, 1995a, y b), efecto que no se detuvo con la adición de agentes con actividad anti-progestacional como el RU 486 (Mifepristona). Por el contrario, la adición del anti-estrógeno tamoxifeno sí logró inhibir este efecto, sugiriendo que el incremento en el crecimiento y la proliferación de las células neoplásicas inducido por las progestinas sintéticas es mediado vía RE intracelular y no por el receptor de progesterona (RP) (Van der Burg *et al.*, 1992). Sin embargo no se consiguió sustentar esta hipótesis debido a que ninguna de estas progestinas sintéticas es reconocida por el sitio activo del subtipo del RE α o del RE β (Chávez *et al.*, 1985; Lemus *et al.*, 1992; Lemus *et al.*, 2000). En los últimos años, se ha contribuido para dilucidar los mecanismos por los cuales las progestinas sintéticas pueden ejercer un efecto de tipo estrogénico (Larrea *et al.*,

2001). Por otra parte, se demostró la bioconversión de las progestinas sintéticas de la serie 19-nortestosterona (Larrea *et al.*, 1987; Lemus *et al.*, 1992; Lemus *et al.*, 2001) a metabolitos reducidos en el anillo A. Los metabolitos 3 β ,5 α -tetrahydro reducidos de estas progestinas sintéticas se unen de manera específica y con alta afinidad al RE α pero no interactúan con el RE β (Larrea *et al.*, 2001). En comparación con sus epímeros, los 3 α ,5 α -tetrahydro reducidos de las tres progestinas, quienes también interactúan de manera selectiva con el RE α , aunque con menor afinidad que los metabolitos correspondiente 3 β ,5 α (Larrea *et al.*, 2001). Por esta observación, los derivados tetrahydro reducidos de las progestinas sintéticas pueden considerarse como moduladores selectivos de los receptores de estrógenos (SERM's). Por otra parte, utilizando sistemas de transactivación en células co-transfectadas con un vector de expresión que contiene el gen del RE α o del RE β y un vector reportero regulado por elementos de respuesta a estrógenos, se logró demostrar que los derivados reducidos en el anillo A de las progestinas sintéticas, son capaces de inducir la transactivación de genes reporteros estrógeno-dependientes a través del RE α . Las progestinas sintéticas sin modificar, no interactúan con el RE ni fueron capaces de inducir efectos de tipo estrogénico en los sistemas celulares de expresión utilizados (Larrea *et al.*, 2001).

Recientemente, el grupo del Dr. Wiebe y sus colaboradores demostraron que en células derivadas de cáncer de mama la P₄ es biotransformada, a diversos metabolitos, los cuales tienen efectos opuestos entre sí en la proliferación y en la adhesión de las células neoplásicas (Wiebe *et al.*, 2000).

Estas observaciones incrementan la importancia de una explicación sobre los posibles mecanismos que la T está llevando a cabo para que se presente el efecto dual. La T es un esteroide con un doble enlace entre los carbonos 4 y 5 (4-eno) que podría ser bioconvertida localmente a metabolitos no fenólicos con actividad de tipo estrogénica intrínseca, por lo que la presencia de otras enzimas que metabolizan a los andrógenos, además de la aromatasa, resultan importantes las cuales ya se han identificado y caracterizado en tejidos y células de cáncer de

mama humano (Bonney *et al.* 1983, Labrie *et al.* 1992, Sasano *et al.* 1996, Labrie *et al.* 1997, Gingras *et al.* 1999, Labrie *et al.* 2000, Suzuki *et al.* 2000, Ariga *et al.* 2000).

Dentro de las enzimas responsables para la conversión de T a DHT, están las 5α -ERasas (EC: 1.3.99.5) (Russell y Wilson, 1994). Existen dos isoformas: la tipo 1 (5α -ERasa1) y la tipo 2 (5α -ERasa2) (Russell y Wilson, 1994; Andersson y Russell, 1990; Andersson *et al.*, 1991). La tipo 1 la codifica el gen *SRD5A1* y la proteína esta compuesta de 259 aminoácidos, tiene un pH óptimo de 6 a 9, mientras que la tipo 2 es codificada por el gen *SRD5A2*, la proteína esta compuesta por 254 aminoácidos y tiene un pH óptimo de 5.5 (Russell *et al.*, 1994). La 5α -ERasa1 y la 5α -ERasa2 fueron localizadas en el carcinoma mamario humano y han sido estudiadas en relación a la 5α -reducción de la T (Suzuki *et al.* 2001).

Algunas investigaciones revelan que las 5α -ERasas reconocen también a otras hormonas esteroides como la P_4 , y que su bioconversión a derivados 5α -reducidos está incrementada en las células neoplásicas estrógeno-sensibles (MCF-7), en comparación con células estrógeno-resistentes (MDA-MB 231), sugiriendo una sobre expresión de los sistemas enzimáticos involucrados en la 5α -reducción del anillo A (Wiebe *et al.*, 2003).

El grupo de Suzuki en Japón con base en sus hallazgos de una sobre-expresión de la 5α -ERasa1 y 5α -ERasa2, ha propuesto que la DHT, producto de la conversión de T por la acción de las enzimas 5α -ERasas puede tener un efecto protector en el cáncer de mama y ha sugerido como tratamiento del cáncer de mama el uso de inductores de esta enzima (Suzuki *et al.*, 2001) pero estos resultados no mencionan la posibilidad de una biotransformación posterior de los metabolitos 5α -reducidos que podrían presentar un efecto diferente al androgénico.

Por lo que es necesario analizar la presencia de las enzimas que biotransforman la DHT hacia el $3\alpha,5\alpha$ -Adiol y al $3\beta,5\alpha$ -Adiol, ya que han sido poco estudiadas en el cáncer de mama humano. De acuerdo a la clasificación de estas enzimas existen cuatro isoformas de la 3α -HEDasa en el humano, las cuales pertenecen a la familia Aldo-ceto reductasas (AKR = Aldo-Keto Reductases). En la glándula mamaria se expresa la $20\alpha(3\alpha)$ -hidroxiesteroide deshidrogenada, que también es conocida como 3β -HEDasa (gen: AKR1C1) y la 3α -HEDasa (gen: AKR1C2) las cuales exhiben actividades enzimáticas combinadas, una sola isoforma puede tener actividades tanto de 3α -oxidoreductasa como de 3β -oxidoreductasa. En el caso de la 3β -HEDasa presenta mayor actividad enzimática para formar el $3\beta,5\alpha$ -Adiol que el $3\alpha,5\alpha$ -Adiol, y para el caso de 3α -HEDasa presenta una mayor actividad para formar al $3\alpha,5\alpha$ -Adiol que al $3\beta,5\alpha$ -Adiol (Dufort *et al.*, 1996; Jez *et al.*, 1997; Penning *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2000; Dufort *et al.*, 2001). La 3α - y la 3β -HEDasa modifican la molécula de la DHT, convirtiendo el grupo ceto del carbono 3 a un grupo hidroxilo y lo colocan en diferente orientación, ya sea alfa o beta, respectivamente, produciendo a los tetrahidos reducidos: $3\alpha,5\alpha$ -Adiol y $3\beta,5\alpha$ -Adiol (figura 5) (Penning *et al.*, 2000; Dufort *et al.*, 2001). Estos tetrahidos reducidos pueden interaccionar con los subtipos del RE y producir un efecto de tipo estrogénico (Thieulant *et al.*, 1981 y 1983) percibiéndose en el crecimiento y la proliferación de las células que sean dependientes de estrógenos, como son las células MCF-7.

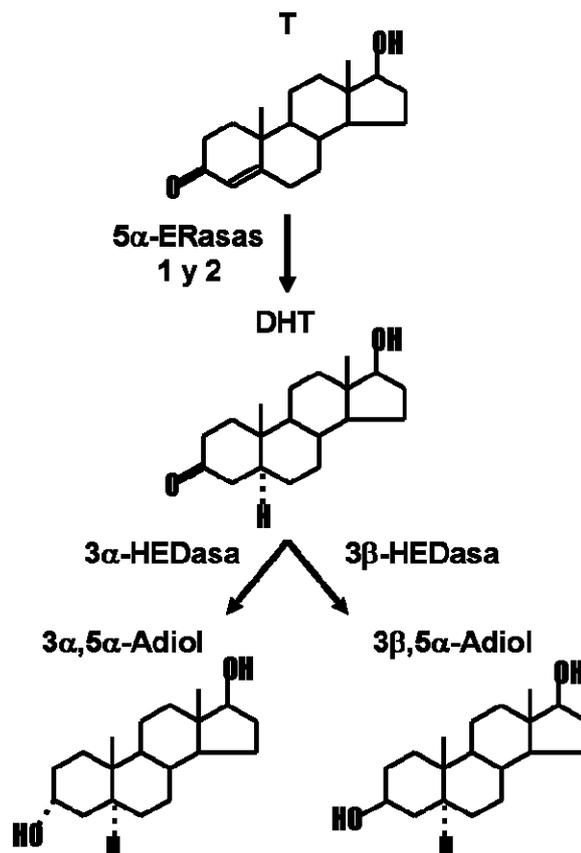


Figura 5. Biotransformación de T a sus metabolitos tetrahidroreducidos. La formación de los Dioles requiere primero de la reducción del doble enlace del anillo A de la molécula de T formando a la DHT, un paso que es mediado por las isoformas: 5α-ERasa1 y 5α-ERasa2. Posteriormente, por la acción de las enzimas específicas: 3β-HEDasa y 3α-HEDasa, se reduce el grupo cetona del carbono 3 formándose un grupo hidroxilo orientándolo en diferente posición ya sea en posición alfa o beta, generando los Dioles: 3α,5α-Adiol y 3β,5α-Adiol, respectivamente.

Para esclarecer la controversia observada por los andrógenos, especialmente por la T, es importante comprender el mecanismo que desencadena el efecto estimulador sobre la proliferación celular. Siendo relevante la actividad enzimática de las células de carcinoma mamario estrógeno dependiente y el patrón de expresión de los genes que codifican para las enzimas 5α-ERasa1, 5α-ERasa2, 3α-HEDasa y 3β-HEDasa.

Estas investigaciones llevaron a plantear la posibilidad de que se presenten diferencias en la capacidad enzimática de las células de carcinoma mamario para biotransformar a la T isotópicamente marcada con ^{14}C (T-[^{14}C]) a sus metabolitos

5 α -reducidos no fenólicos, así como estudiar el patrón de expresión del ácido ribonucleico mensajero (ARNm) que codifica para cada una de las enzimas que biotransforman a la T a compuestos reducidos en el anillo A, en particular en las células MCF-7 (dependientes de estrógenos, con RE α y RE β positivos) y las células MDA-MB 231 (no dependientes de estrógenos, con RE α negativo).

Para determinar si los andrógenos son bioconvertidos a derivados reducidos en el anillo A con una potencia agonista estrogénica en el cáncer de mama, se estudio el metabolismo de la T-[¹⁴C] en células de cáncer mamario humano dependientes de estrógenos (MCF-7) y en células de cáncer mamario humano no dependientes de estrógenos (MDA-MB 231).

3. JUSTIFICACIÓN.

Algunas investigaciones han revelado que la T presenta efectos controversiales con respecto a su capacidad para estimular la proliferación de las células de cáncer de mama humano, ya que a concentraciones fisiológicas es capaz de incrementar la proliferación de algunas líneas celulares derivadas de cáncer mamario humano estrógeno-dependiente. Este efecto es detenido por antiestrógenos, pero al utilizar inhibidores de la aromatasa se continúa observando un efecto remanente de tipo estrogénico. Estas investigaciones han causado gran controversia debido a que se ha demostrado que la molécula de la T *per se* no interacciona con RE y, por ende, no puede ejercer efectos de tipo estrogénico. Sin embargo, no existen reportes que puedan explicar completamente el efecto dual de la T sobre las líneas celulares de cáncer mamario. Estudios previos en nuestro laboratorio demostraron que los Dioles, metabolitos 5α -reducidos de la T, son capaces de interaccionar con ambos subtipos del RE y ejercer efectos de tipo estrogénico débiles pero que, en concentraciones farmacológicas, pueden ser semejantes al observado para el E_2 .

Lo anterior nos condujo a realizar análisis bioquímicos y moleculares que permitan examinar si las células de carcinoma mamario humano son capaces de biotransformar a la T en Dioles en forma intracrina, así como determinar la expresión de las enzimas que participan en su formación, a través de la cuantificación de la expresión de los ARNm que los codifican. Con estos resultados se podrá esclarecer, al menos parcialmente, los mecanismos por los cuales la T es capaz de promover efectos de tipo estrogénico e incrementar el riesgo de desarrollar el carcinoma mamario, en particular en las mujeres posmenopáusicas, por la presencia de andrógenos de origen suprarrenal. Por otro lado, estos estudios permitirán sentar las bases para el desarrollo de estrategias terapéuticas que puedan prevenir la aparición del cáncer mamario en etapas tempranas.

4. OBJETIVOS.

4.1. GENERAL.

Determinar la capacidad enzimática de las células de carcinoma mamario, para biotransformar la T-[¹⁴C] a sus metabolitos reducidos en el anillo A, así como determinar la expresión de los ARNm que codifican para las enzimas 5 α -ERasa1, 5 α -ERasa2, 3 α -HEDasa y 3 β -HEDasa.

4.2. PARTICULARES.

4.2.1. Establecer el destino metabólico de la T isotópicamente marcada con ¹⁴C en las líneas celulares humanas de carcinoma mamario MCF-7 cuyo crecimiento es dependiente de estrógenos, en células MDA-MB 231 cuyo crecimiento es independiente de estrógenos y en células HeLa derivadas de cáncer cérvico-uterino mantenidas en cultivo.

4.2.2. Cuantificar la expresión de los ARNm que codifican para las enzimas 5 α -ERasa1, 5 α -ERasa2, 3 α -HEDasa y 3 β -HEDasa en células MCF-7, en células MDA-MB 231 y en células HeLa.

4.2.3. Correlacionar la capacidad enzimática de las células de carcinoma mamario humano para biotransformar la T-[¹⁴C], con la expresión del ARNm de las enzimas 5 α -ERasa1, 5 α -ERasa2, 3 α -HEDasa y 3 β -HEDasa.

5. HIPÓTESIS.

Las células de carcinoma mamario (MCF-7) que requieren estrógenos para proliferar, biotransforman más eficientemente a la T hacia metabolitos reducidos en el anillo A, debido a que esta incrementada la expresión de los ARNm que codifican para las enzimas 5α -ERasa1, 5α -ERasa2, 3α -HEDasa y 3β -HEDasa, en comparación con las células cuya proliferación es independiente de estrógenos (MDA-MB 231).

6. MATERIALES Y MÉTODOS.

6.1. *Material Biológico.*

Se utilizaron tres líneas celulares: dos derivadas de carcinomas mamarios y una cérvico-uterina: (1) células MCF-7, estrógeno dependientes originalmente obtenidas por efusión pleural de una metástasis derivadas de un adenocarcinoma mamario humano *in vitro*, son tumorigénicas, con débil actividad metastática, presentan fenotipo característico de células luminales del epitelio ductal de la mama, son positivas para RE α y RE β , así como RA y RP. (2) Células MDA-MB 231, no dependientes de estrógenos, obtenidas de una metástasis proveniente de un adenocarcinoma mamario humano, no son positivas al RA y al RP, ni al RE α , pero sí expresan, aunque débilmente, al RE β . (3) Células HeLa, de cáncer cérvico-uterino, no expresan a los subtipos del RE, RA y RP. Las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB 231 fueron amablemente proporcionadas por el Dr. Alejandro Zentella (Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición, Salvador Zubirán, Ciudad de México) y las células HeLa se obtuvieron de la compañía American Tissue Cell Culture (Rockville, MD, EUA).

6.2. *Material Radiactivo.*

La T-4-[¹⁴C], con actividad específica de 50 mCi/mmola, se obtuvo de la compañía American Radiolabeled Chemicals, Inc. (San Luis, MO, EUA). La pureza radioquímica del esteroide radiactivo se verificó por cromatografía de partición en papel, en dos sistemas de diferente polaridad y por cristalizaciones sucesivas de alícuotas, adicionadas con el autentico esteroide radioinerte, hasta la obtención de actividad específica constante.

6.3. Esteroides Radioinertes.

Los esteroides radioinertes que se utilizaron fueron: T, DHT, $3\alpha,5\alpha$ -Adiol y $3\beta,5\alpha$ -Adiol que adquirieron en Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA). La pureza química de cada uno de los esteroides se determinó, después de cristalizaciones sucesivas en disolventes apropiados, por medio de su movilidad cromatográfica en placa fina y por sus constantes fisicoquímicas como punto de fusión, análisis del espectro de infrarrojo y resonancia magnética nuclear. El inhibidor de la 5α -ERasa1 y de la 5α -ERasa2, Finasteride[®], fue obtenido de Merck Sharp & Dohme (México).

6.4. Medio de cultivo celular.

El medio de cultivo utilizado para todas las células fue el de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM; Life Technologies, Gaithersburg, MD, EUA), libre de rojo de fenol, pH de 7.4, esterilizado por filtración a través de membranas de nylon con poro de 0.22 μm (Corning, NY, EUA). En el momento de realizar el experimento se agregó suero de bovino fetal (SBF; Gibco BRL, Gaithersburg, MD, EUA) al 10% (v/v), aminoácidos no esenciales a una concentración final de 100 μM , piruvato de sodio 100 μM , L-glutamina 2 mM, una solución comercial de antibióticos (penicilina 100 U/mL, estreptomina 100 $\mu\text{g/mL}$) y de antimicótico (anfotericina B 250 ng/mL) (Life Technologies, Gaithersburg, MD, EUA).

6.5. Cultivo de las células MCF-7, MDA-MB 231 y HeLa.

Se sembraron 6×10^6 células en botellas de cultivo con una superficie de 75 cm^2 y se mantuvieron en incubador a 37° C, con atmósfera húmeda de 5% de CO_2 en aire, hasta alcanzar el 100% de confluencia. Posteriormente, las células se cosecharon con tripsina al 0.25% y 1 mM de ácido etilén diamino tetraacético (EDTA). Las suspensiones celulares se centrifugaron a 286 g durante cinco min., se desechó el sobrenadante y el botón celular se resuspendió en medio de cultivo

y se re-sembraron bajo las condiciones experimentales requeridas para realizar los estudios de metabolismo o análisis de expresión de los ARNm que codifican para las enzimas que biotransforman a la T a sus metabolitos 5α -reducidos.

6.6. Estudios de metabolismo in vitro de T-[14 C].

6.6.1. Incubación de las células con T-[14 C].

Las células MCF-7, MDA-MB 231 y HeLa se sembraron por separado en cajas de Petri de 60 cm², a una densidad aproximada de 2×10^6 células, con DMEM suplementado con SFB al 10% (v/v) de durante 24 hrs., lo cual permitió la adhesión celular. Posteriormente, el medio de cultivo se retiró y se reemplazó por DMEM suplementado con 5% (v/v) de SFB previamente inactivado por calor y tratado con una suspensión de carbón activado y dextran T-70 (10:1), para adsorber los esteroides endógenos (SBF-C), incubando por 24 hrs. adicionales para permitir que las células se adaptaran a un medio libre de esteroides. Al término de este tiempo, el medio de los cultivos se reemplazó por DMEM suplementado con 5% de SBF-C y en ausencia o presencia de concentraciones crecientes (0.5-10 μ M) del sustrato esteroide radiactivo (T-[14 C]). Las células se incubaron por diferentes períodos de tiempo (30 min. hasta 48 hrs.). Se realizaron también incubaciones adicionales en ausencia o presencia de F, inhibidor de las 5α -ERasas

Al término de las incubaciones, la actividad enzimática de las células se detuvo al colocar las cajas de cultivo sobre hielo (4^o C). Finalmente, las células se desprendieron de las cajas de Petri con la ayuda de un gendarme, se transfirieron a tubos cónicos. De los extractos celulares, se utilizó una alícuota para la cuantificación de las proteínas con la finalidad de normalizar cada experimento con respecto a la concentración total de proteínas utilizando el método de Bradford (1976); y el resto se utilizó para la determinación del metabolismo de la T-[14 C]

6.6.2. Extracción de los Metabolitos formados durante la incubación.

A la fase acuosa que contiene a las células incubadas se agregaron 30 mL de acetato de etilo (EtOAc) saturado con agua, se agitó vigorosamente en un agitador Vortex[®] durante 1 min. para lograr la ruptura mecánica de las células e iniciar la extracción de los productos del metabolismo de la T-[¹⁴C]. La separación del EtOAc (fase orgánica) del medio acuoso se logró por centrifugación a 800 g, durante 10 min. a 4° C. La fase orgánica se recolectó en un matraz de fondo redondo y el proceso se repitió dos veces con el mismo volumen de EtOAc. Las fases orgánicas recolectadas se evaporaron a sequedad en un evaporador rotatorio con vacío y los extractos orgánicos se resuspendieron en metanol. Para determinar la eficiencia del proceso de extracción, se tomaron alícuotas representativas de cada experimento para medir el contenido de ¹⁴C, en un espectrómetro de centelleo líquido Packard Tricab[®] (Modelo 1900TR; Pakard Downers Grove, IL, EUA). La eficiencia de conteo para ¹⁴C fue del 86% y en todas las muestras se corrigió el “quenching” con el método de estandarización externa.

Al extracto metanólico se le agregaron 10 µg de cada uno de los siguientes esteroides radioinertes (T, DHT, 3α,5α-Adiol y 3β,5α-Adiol) como “carriers” que, al incrementar la masa de los compuestos radiactivos formados, permiten su visualización por medios físicos, como la absorción de luz ultravioleta, o por la formación de complejos coloridos, con reactivos específicos.

6.6.3. Análisis de los Metabolitos de T-[¹⁴C] por la técnica de Dilución Isotópica Inversa.

La separación, purificación e identificación de los productos de la conversión metabólica de la T-[¹⁴C] se realizó por el método de dilución isotópica inversa (Lemus *et al.*, 1992), mediante la determinación de la movilidad cromatográfica en placa fina de sílica gel, en los sistemas cloroformo:acetona (9:1) y benceno:acetato de etilo (2:1). Los esteroides utilizados como referencias se visualizaron en las placas de cromatografía con una mezcla de 100 mL de ácido

acético glacial, 2 mL de ácido sulfúrico concentrado y 1 mL de *p*-anisaldehído y por exposición a calor a 150° C durante 3 min.

La detección en las placas de cromatografía de las zonas marcadas con ¹⁴C se realizó mediante un analizador de imágenes Packard Instant Imager (Packard Downers Grove, ILL, EUA). Las zonas del cromatograma que correspondieron a cada uno de los esteroides formados se cortaron, se eluyeron con metanol en tubos de vidrio con bajo contenido de ⁴⁰K, se les adicionó una solución de centelleo (4 g de PPO [2,5-difenil oxazol], 100 mg de dimetil POPOP [1,4-bis-2(4-metil-5-fenil-oxazolil) benceno] en un litro de tolueno de grado centelleo) y se contaron en el espectrómetro de centelleo líquido. Cada experimento se realizó por triplicado y los resultados de la actividad enzimática se expresan como el porcentaje de bioconversión de T en sus metabolitos reducidos en el anillo A.

Con la finalidad de demostrar que el metabolismo de la T-[¹⁴C] fue realizado por la actividad enzimática de las células, se utilizaron controles experimentales donde se incubó 10 µM de T-[¹⁴C] en el medio de cultivo en ausencia de células, durante 48 hrs. y en células inactivadas por calor (ebullición).

6.7. Análisis de la expresión de los ARNm que codifican para las enzimas que biotransforman a la T.

6.7.1. Extracción del ARN por la técnica de Isotiocianato de Guanidina.

Los experimentos para analizar la expresión de los ARNm que codifican a las enzimas que biotransforman a la T en sus metabolitos tetrahidroreducidos (5α -ERasa1, 5α -ERasa2, 3α -HEDasa y 3β -HEDasa) en las líneas celulares MCF-7 y MDA MB 231, se realizaron de acuerdo a los métodos descritos por Chomcynski y Sacci (1987) y Ausbel (1992), utilizando cultivos con una densidad de 6×10^6 células por experimento y 1 mL del reactivo TRIZOL[®] (Invitrogen) a cada uno, en tubos de polipropileno de 5 mL, nuevos y estériles para homogeneizar completamente por agitación vigorosa en un Vortex[®]. Para permitir la completa disociación del complejo de nucleoproteínas, la mezcla se incubó a temperatura ambiente por 5 min., se agregaron 200 μ L de cloroformo, se agitó vigorosamente por 15 seg., se vertió el contenido en tubos Eppendorf de 1.5 mL de microcentrifuga, se incubaron a temperatura ambiente por 3 min. y se centrifugaron a 12,000 g por 15 min.

Al final de la centrifugación, la mezcla se separó en una fase inferior roja (orgánica), una interfase blanca y una fase superior incolora (acuosa), la cual contenía al ARN total; esta última se transfirió a tubos nuevos de 1.5 mL, se agregaron 500 μ L de isopropanol y se incubó durante toda la noche a -20° C para precipitar el ARN total. Al día siguiente se centrifugaron a 12,000 g durante 10 min., obteniéndose un precipitado blanco que correspondió al ARN total. El sobrenadante se decantó y al precipitado se le agregó 1 mL de etanol al 75% en agua con dietilpirocarbonato al 0.1% (H₂O-DEPC; inhibidor de RNasas). Las muestras se agitaron de forma vigorosa hasta que se desprendió el precipitado blanco, se centrifugó a 7,500 g por 5 min., se desechó el etanol-H₂O-DEPC y el precipitado se secó cuidadosamente al vacío mediante una pipeta Pasteur estéril, con la punta adelgazada. El ARN se resuspendió en 20-100 μ L de H₂O-DEPC.

Se procedió a la cuantificación de la concentración del ARN obtenido, 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 280 nm, la cual debió ser mayor de 1.8 para ser utilizado (Chomcynski y Sacci, 1987; Ausbel, 1992). Las muestras de ARN se alicuotaron (10 µg) y se guardaron a -70° C hasta el momento de realizar los análisis de expresión.

6.7.2. Análisis de los ARN en electroforesis en geles de agarosa en condiciones desnaturalizantes.

Para observar la integridad del ARN obtenido, se separó con base en su peso molecular mediante las técnicas de Chomcynski y Sacci (1987) y Ausbel, (1992). Realizando electroforesis en geles de agarosa al 1.0% (Invitrogen; grado Biología Molecular), empleando una solución amortiguadora de ácido 3-[N-Morfolino] propanosulfónico 1X (MOPS) y formaldehído al 7% como agente desnaturalizante. Cada muestra de ARN se desnaturalizó por la adición de 10 µL de una solución integrada por formamida 50%, MOPS 1X y formaldehído 7% (solución FMF), y se calentaron a 75° C en un termobloque (Boekel Industries Inc., EUA) por 5 min., se mantuvieron en hielo por 5 min. y se centrifugaron a 9000 g. Después del proceso de desnaturalización, a cada muestra se le adicionó 2 µL de la solución de carga para ARN (glicerol 30%, azul de bromofenol 0.1% y xilen cianol 0.1%) 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 desarrollo electroforético a 75 volts por 60-90 min. (Davis *et al.*, 1986; Chomcynski y Sacci, 1987; Ausbel, 1992).

6.7.3. Análisis de la expresión de las enzimas a través de sus ARNm

Para realizar la determinación semicuantitativa de la expresión de los ARNm que codifican a cuatro de las enzimas que biotransforman a la T, se requirió la síntesis de los amplicones respectivos por medio de las técnicas de retrotranscripción (RT) (Sanger y Coulson, 1975; Sanger *et al.*, 1977; Davis *et al.*, 1986,) seguida de

la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), a partir de los ARN totales obtenidos de cada experimento.

Primeramente se realizó la obtención del ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc) a partir de 50 ng de cada ARNm, empleando el estuche comercial SuperScript First-Strand Synthesis System[®] para RT-PCR (Invitrogen, CA, EUA), siguiendo las indicaciones del fabricante. El ARN extraído de las células se mezcló con 10 mM de cada uno de los desoxinucleótidos trifosfato (dNTP's): dATP, dCTP, dGTP, dTTP; 0.5 µg de la solución de oligo(dT)₁₂₋₁₈, se ajustó el volumen a 10 µL con H₂O-DEPC y la mezcla se incubó a 65° C por 5 min., seguido por 1 min. en hielo. Por separado, se preparó una mezcla con buffer RT 1X, MgCl₂ 2.5 mM, ditiotretitol 10 mM e inhibidor de ribonucleasas (RNasaOUT[®]) 2 U, esta mezcla se adicionó al primer tubo que contenía el ARN y se incubó a 42° C por 2 min. Posteriormente, se agregó la enzima SUPER SCRIPT II RT[®] 2.5 U y se incubaron a 42° C por 50 min. para llevar a cabo la reacción de síntesis del ADNc. La reacción enzimática terminó al incubar los tubos a 70° C por 15 min., finalmente se incubaron con la enzima RNasa H 2 U a 37° C, por 20 min., con la propósitos de remover los ARN existentes. Los productos se guardaron a -70° C hasta su utilización.

Con la finalidad de amplificar las secuencias específicas de ADNc que codifican para la 5 α -ERasa1 (SRD5A1), la 5 α -ERasa2 (SRD5A2), la 3 α -HEDasa (AKR1C1) y la 3 β -HEDasa (AKR1C2) humanas se utilizaron secuencias de oligonucleótidos de 20 pares de bases cada uno (Laboratorio Accesolab, México), cuyas secuencias fueron diseñadas mediante el programa computacional 'Primer 3' (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi), con base en las secuencias de los ADNc reportadas (Gene Bank; National Institute of Health, EUA) y se tomaron en cuenta la temperatura de hibridación óptima, la relación adecuada de bases GC/AT y se evitó la formación de enlaces inter e intracatenarios entre los mismos oligonucleótidos. Además, como sonda de normalización se sintetizó el ADNc de la enzima gliceraldehído 3-fosfato

deshidrogenasa (G3PDH) humana, cuya expresión es constitutiva en estas líneas celulares.

En la siguiente tabla 2 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)

Tabla 2. Secuencias de los oligonucleótidos utilizados amplificar el ARNm que codifica para las enzimas que biotransforman a la T a sus metabolitos: 5 α -ERasa1, la 5 α -ERasa2, la 3 α -HEDasa y la 3 β -HEDasa.

GENES (código Gene Bank)	Secuencia de oligonucleótidos	Tamaño del amplión (pb) Temperatura melting (°C)
SRD5A1 5α-ERasa1 NM_001047	Sentido 5'-TGG GAG GAG GAA AGC CTA TG-3' Antisentido 5'-GCC ACA CCA CTC CAT GAT TTC-3'	308 (52 °C)
SRD5A2 5α-ERasa2 NM_000348	Sentido 5'-CAT ACG GTT TAG CTT GGG TGT-3' Antisentido 5'-GCT TTC CGA GAT TTG GGG TAG-3'	315 (52 °C)
AKR1C2 3α-HEDasa NM_001354	Sentido 5'-GTA AAG CTC TAG AGG CCG T-3' Antisentido 5'-CAC CCA TGG TTC TTC TCG A-3'	590 (60 °C)
AKR1C1 3β-HEDasa NM_001353	Sentido 5'-GTA AAG CTT TAG AGG CCA C-3' Antisentido 5'-CAC CCA TGC TTC TTC TCG G-3'	590 (60 °C)
G3PDH (Normalización) NM_002046	Sentido 5'-TTC GCT CTC TGC TCC TCC TG-3' Antisentido 5'-ACC CGT TGA CTC CGA CCT TC-3'	557 (64 °C)

Para cada PCR se utilizó una alícuota de 2 μ L del ADNc (producto de la reacción de RT), $MgCl_2$ 2.5 mM, cada uno de los dNTP's 0.5 mM, cada uno de los oligonucleótidos (sentido y antisentido) 1 μ M y Taq ADNpolimerasa Platinum[®] (Invitrogen) 5 U, en un volumen final de 50 μ L. Las condiciones que se utilizaron para los PCR fueron las siguientes: una fase de desnaturalización del ADNc a 94° C, por 5 min., seguida por 30 procesos cíclicos, donde cada uno constó de una fase a 94° C por 30 seg. (desnaturalización del ADN), una fase a la temperatura señalada en la tabla 2 para cada gen, por 30 seg. (alineamiento de los oligonucleótidos) y una a 72° C por 30 seg. (extensión de la cadena de ADN). Por ultimo, se realizó una fase de extensión final a 72° C por 7 min.

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 1.2 % (p/v) y como buffer de corrimiento fue TBE al 0.5X (Tris Base 10 mM, ácido bórico 10 mM y EDTA 10 mM) a 75 volts por 45 min. Al final del desarrollo electroforético, los productos de PCR se visualizaron mediante el colorante fluorescente bromuro de etidio (1 μ g/mL), el cual se intercala entre al ADN y fluoresce al ser estimulado con luz ultravioleta. Las imágenes de cada una de las bandas se analizaron por densitometría en el sistema de análisis de imágenes Gel Logic 200[®] (Kodak, EUA). Los resultados se expresan en número de pixeles (densidad óptica relativa; DO) del gen de interés con respecto al gen de normalización G3PDH. 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 (Glenn y Glenn, 1994) para su posterior secuenciación.

6.7.4. Análisis estadístico.

La comparación de los grupos experimentales con respecto a los grupos control en los experimentos de biotransformación de la T *in vitro* se realizó por análisis de varianza de una vía y las diferencias estadísticas entre grupos se establecieron por la prueba de t de Student, utilizando el programa computacional SigmaStat

(Jandel Corporation, San Rafael, CA, USA) y las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0.001$. Para los estudios de análisis de la expresión de las enzimas, se utilizó la prueba ANOVA y las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0.05$.

7. RESULTADOS.

7.1. Formación *in vitro* de metabolitos 5 α -reducidos de T-[¹⁴C] en las células MCF-7, MDA-MB 231 y HeLa.

Para demostrar que el metabolismo de la T-[¹⁴C] es debido a la actividad enzimática de las células MCF-7, se consideraron como controles experimentales a incubaciones con T-[¹⁴C] 10 μ M en medio de cultivo en ausencia de células, durante 48 h y a células inactivadas por calor (ebullición). Los resultados obtenidos se muestran en la figura 6, donde solamente se detectó la presencia de T-[¹⁴C] sin modificar.

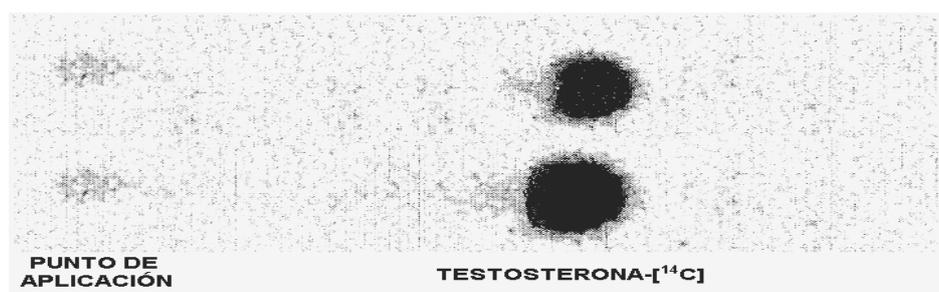


Figura 6. Perfil cromatográfico representativo de los controles experimentales con incubaciones realizadas solo con T-[¹⁴C]. Utilizando a T-[¹⁴C] 10 μ M en ausencia de células (superior) y con células MCF-7 inactivadas por calor (inferior), se observa que no hubo modificación de la molécula de la T, pues muestra solamente la presencia del sustrato sin modificar y el punto de aplicación.

A partir de los extractos orgánicos (metanólicos), obtenidos por partición después de las incubaciones con T-[¹⁴C] para cada cultivo de las líneas celulares estudiadas, la recuperación del material radioactivo en la fracción orgánica fue del 96 al 98%. De cada extracto metanólico se tomaron alícuotas que se separaron por cromatografía de placa fina.

Para las células MCF-7 se detectaron cinco zonas radioactivas, como se muestra en la figura 7, donde la zona 1, con un $R_f = 0.22$, contenía los productos de mayor conversión metabólica de la T-[¹⁴C], los cuales tuvieron un

comportamiento cromatográfico idéntico a los “carriers” del ambos Dioles: $3\alpha,5\alpha$ -Adiol y $3\beta,5\alpha$ -Adiol, los cuales no se pudieron separar entre sí por esta técnica por presentar características similares de polaridad. Por otro lado, la zona 2 ($R_f = 0.34$) fue identificada como T- $[^{14}\text{C}]$ sin transformar, la zona 3 ($R_f = 0.46$) correspondió a DHT, la 4 ($R_f = 0.55$) a la androstendiona (Δ^4 -A) y la zona 5 ($R_f = 0.61$), en mínima cantidad, la 5α -androstendiona (5α -A). La cantidad de radiactividad de cada zona del cromatograma se determinó por densitometría de las zonas radiactivas (Packard Instant Imager) y los valores obtenidos fueron graficados como se muestra en las figuras 7, 8 y 9.

Después de la elución, la pureza radioquímica de los metabolitos de la T- $[^{14}\text{C}]$ se determinó mediante recristalizaciones sucesivas de alícuotas representativas de las principales zonas cromatográficas en presencia de cada metabolito radioinerte ($3\alpha,5\alpha$ -Adiol, $3\beta,5\alpha$ -Adiol, DHT y Δ^4 -A) hasta obtener una actividad específica constante, es decir que el valor de los cristales (desintegraciones por minuto por mg) se aproximó al de las aguas madres, como se muestra en la tabla 7.1. Para las células MCF-7 se observó que la formación del metabolito $3\alpha,5\alpha$ -Adiol fue aproximadamente el doble que la de su isómero 3β .

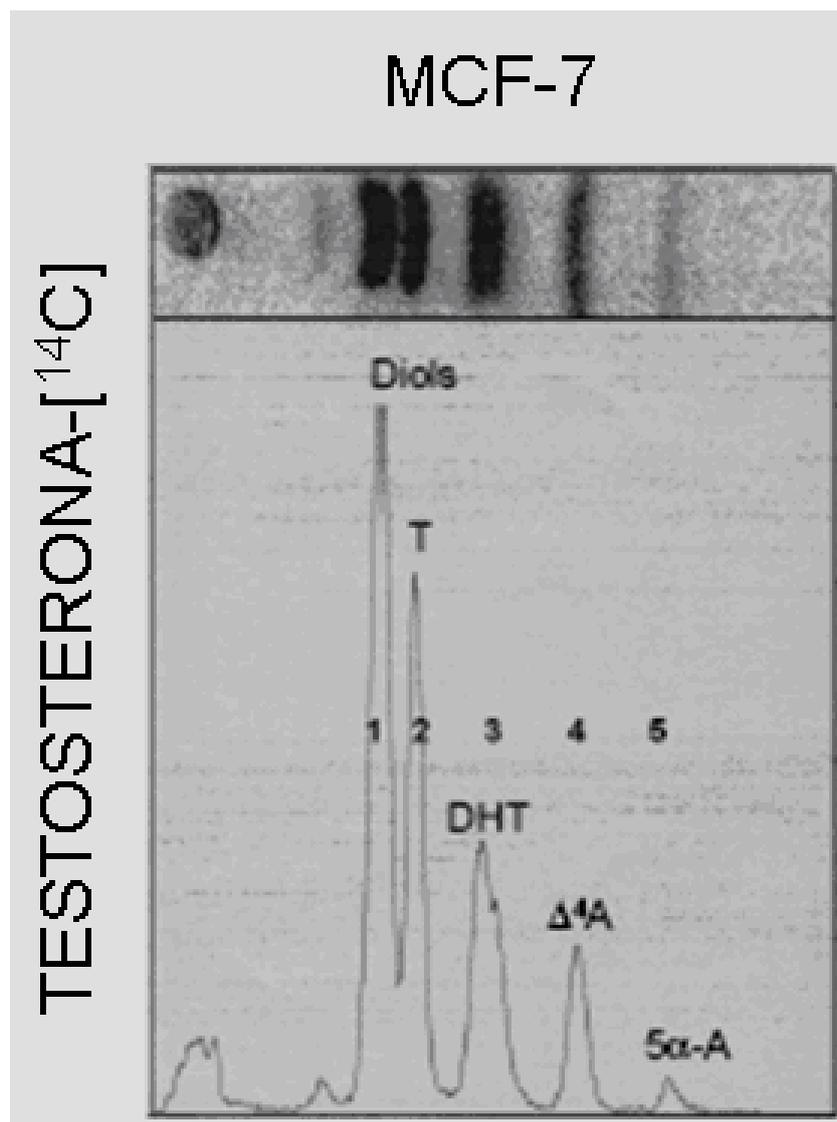


Figura 7. Perfil cromatográfico representativo de los extractos orgánicos de células MCF-7, después de la incubación con T-[¹⁴C]. Alícuotas de los extractos fueron aplicados a una placa en capa fina para cromatografía usando dos sistemas de solventes de diferente polaridad. Las zonas radioactivas detectadas se enumeraron de acuerdo a su movilidad cromatográfica. Los productos de mayor conversión metabólica fueron los Dioles (3α,5α-Adiol y 3β,5α-Adiol; Zona 1), la DHT (Zona 3) y la Δ⁴-A (Zona 4), mientras que se detecta en mucho menor proporción a la 5α-A (Zona 5). La Zona 2 corresponde a T sin biotransformar.

Tabla 3. Pureza radioquímica de los metabolitos aislados después de la incubación *in vitro* con T-[¹⁴C] en células MCF-7. Determinada a través de recristalizaciones sucesivas de las fracciones cromatográficas.

C= Cristales, AM= Aguas Madre

Metabolitos radioinertes	FRACCIÓN	Actividad específica (dpm [¹⁴C] /mg)
3α,5α-Adiol	C1	797
	C2	658
	C3	597
	AM3	504
3β,5α-Adiol	C1	385
	C2	291
	C3	214
	AM3	224
DHT	C1	741
	C2	660
	C3	697
	AM3	515
Δ^4-A	C1	981
	C2	763
	C3	525
	AM3	493

El análisis cromatográfico de los extractos metanólicos de las células MDA MB 231, las cuales no dependen de estrógenos para su crecimiento (Fig. 8), exhibió un patrón metabólico diferente al de las células estrógeno-dependientes MCF-7, ya que se observa mucho menor bioconversión de T-[¹⁴C], principalmente hacia la DHT y a Diones, así como mínima formación tanto de Δ^4 -A como de 5 α -A.

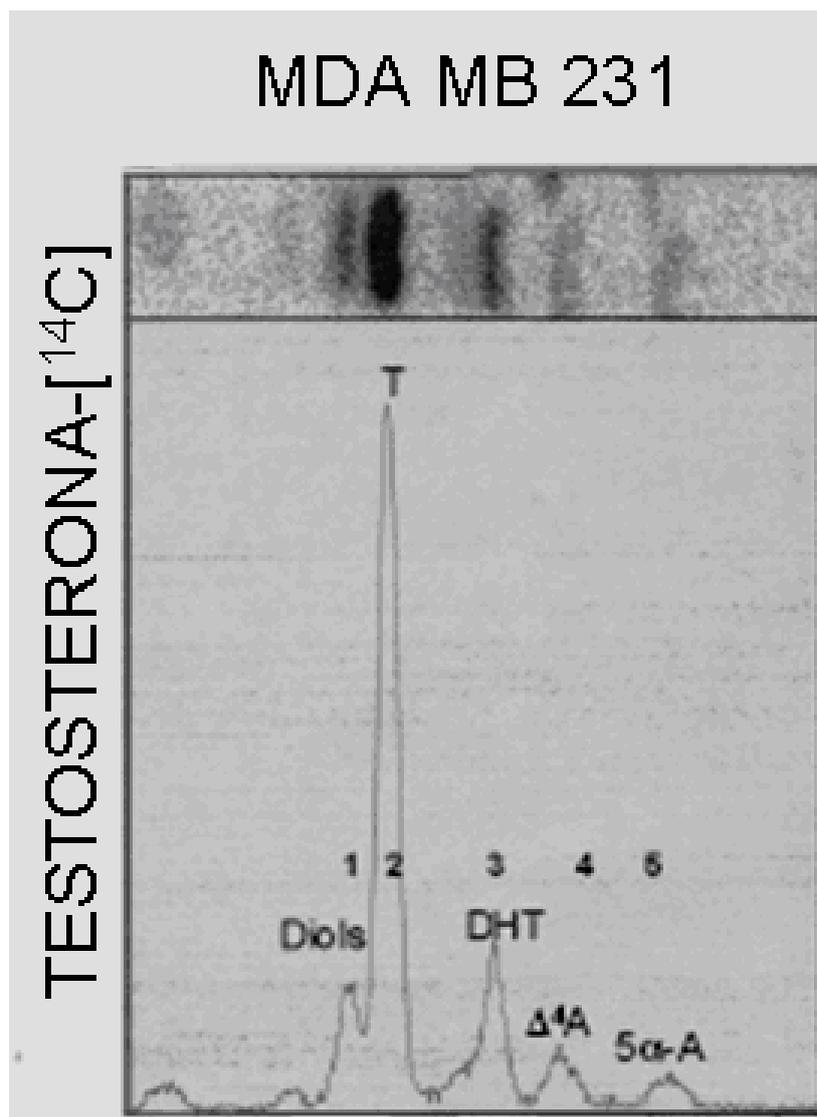


Figura 8. Perfil cromatográfico representativo de los extractos orgánicos de células MDA-MB 231, después de la incubación con T-[¹⁴C]. Los productos de mayor conversión metabólica fue la DHT (Zona 3) y los Dioles (3 α ,5 α -Adiol y 3 β ,5 α -Adiol; Zona 1), mientras casi es imperceptible la presencia de Δ^4 -A (Zona 4) y 5 α -A (Zona 5). La Zona 2 corresponde a T sin biotransformar.

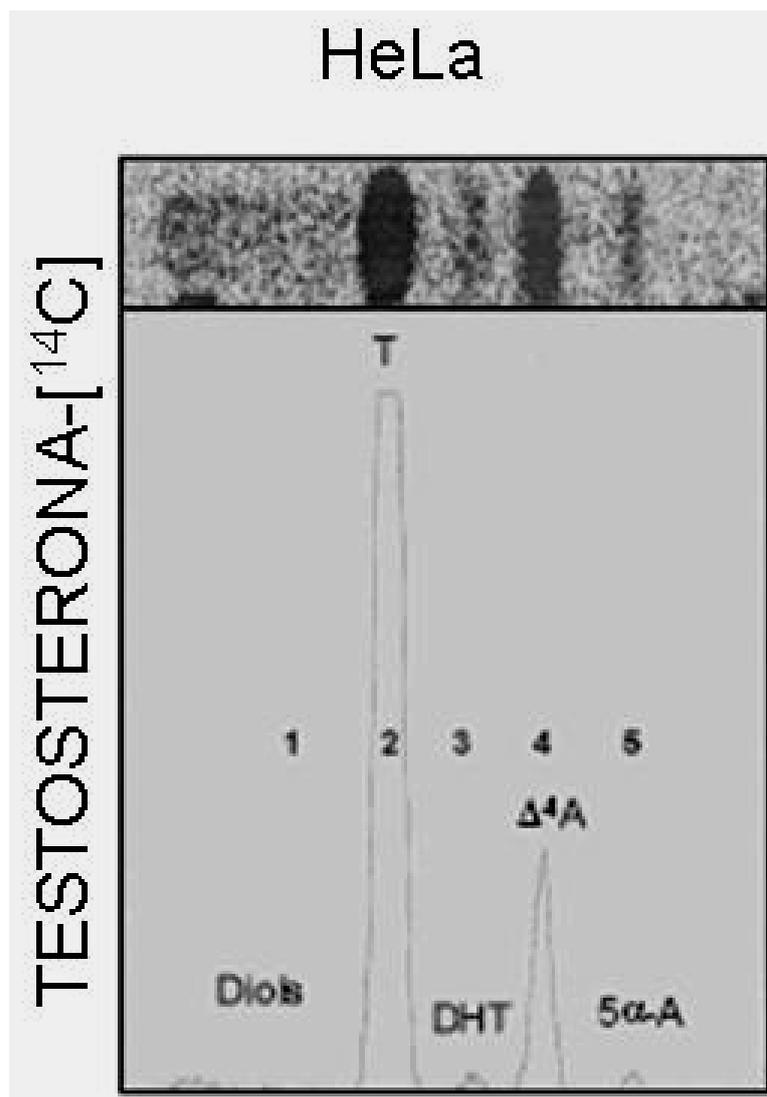


Figura 9. Perfil cromatográfico representativo de los extractos orgánicos de células HeLa, después de la incubación con T-[¹⁴C]. El producto de mayor conversión metabólica fue la Δ^4 -A (Zona 4), mínima formación de 5 α -A (Zona 5) y nula formación de DHT (Zona 3) y de los Dioles (3 α ,5 α -Adiol y 3 β ,5 α -Adiol; Zona 1). La Zona 2 corresponde a T sin biotransformar.

En el caso de la línea celular de cáncer cervical, HeLa, el análisis cromatográfico de los extractos metanólicos revela un patrón de conversión de T- $[^{14}\text{C}]$ completamente diferente (Fig. 9) al observado en las líneas celulares de carcinoma mamario, caracterizándose por la gran formación de $\Delta^4\text{-A}$ y, mínima conversión hacia $5\alpha\text{-A}$ y nula formación de DHT y de los Dioles.

A partir de los estudios del metabolismo de la T se puede señalar que en ambas líneas celulares de carcinoma mamario (MCF-7 y MDA MB 231) se producen los metabolitos 5α -reducidos en el anillo A de la T (DHT y los Dioles), aunque en cantidades diferentes. Por otro lado, en la línea celular de cáncer cervical (HeLa) el producto principal fue la $\Delta^4\text{-A}$, sin la formación de DHT y, por ende, de los androstandioles. En las tres líneas celulares estudiadas, la formación del metabolito $5\alpha\text{-A}$ fue mínima, pero detectable. Cabe hacer notar que este sistema cromatográfico no está diseñado para identificar productos aromáticos de los andrógenos, como el estradiol o la estrona.

7.2. Cinética del metabolismo de la T-[¹⁴C] en las líneas celulares MCF-7, MDA MB 231 y HeLa con respecto a la concentración del sustrato.

Con la finalidad de determinar el metabolismo de la T-[¹⁴C], las incubaciones se realizaron con concentraciones crecientes de sustrato (0-10 μ M), a 37°C, por 2 h, utilizando medio de cultivo ajustado a dos pH diferentes, esto último debido a que la actividad óptima de la enzima 5 α -ERasa1 es a pH 7.4, mientras que el de la enzima 5 α -ERasa2 es a pH 5.2. Cabe recordar que estas enzimas biotransforman irreversiblemente la T en DHT, metabolito requerido para la formación de los Dioles.

7.2.1 Cinética del metabolismo de la T-[¹⁴C] en la línea celular MCF-7.

El metabolismo de la T en células MCF-7, en función de concentración del sustrato, se muestra en la figura 10. El patrón metabólico de la biotransformación de la T-[¹⁴C] en células MCF-7 fue similar cuando las incubaciones se llevaron a cabo a ambos pH's, con la diferencia de que la concentración de metabolitos de la T formados es notablemente mayor cuando el medio de cultivo tiene pH de 7.4 (figura 10A). Los Dioles fueron identificados como los productos de mayor conversión metabólica en estas células, siendo directamente proporcional su formación cuando se incubaron con las concentraciones de 0.25 hasta 2.5 μ M de T, posteriormente aumenta lentamente hasta la concentración de 10 μ M, que fue la máxima utilizada en estos experimentos. La formación de DHT es inferior a la de los Dioles y a la de Δ^4 -A, aproximadamente 250 pmol/mg de proteína/h. La formación de Δ^4 -A fue 250 pmol/mg de proteína/h. a pH 5.2, pero solo cuando hay altas concentraciones de sustrato, pero no a pH 7.4.

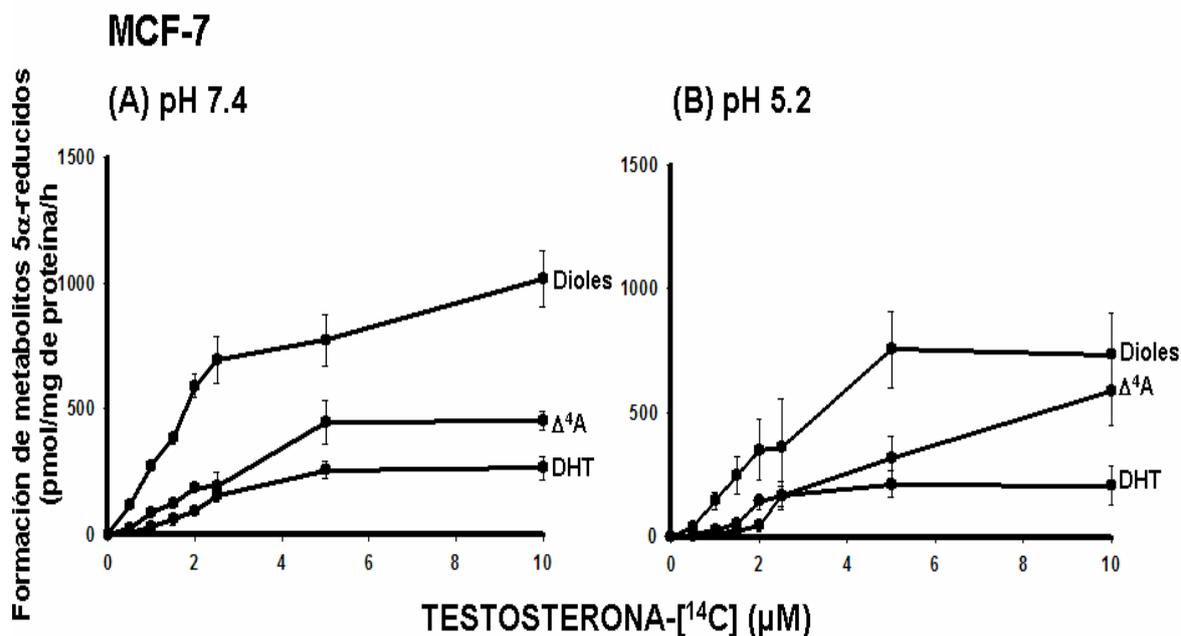


Figura 10. Bioconversión de T-[14 C] a metabolitos no-fenólicos en células MCF-7, en función de la concentración de sustrato, durante 2 hrs. Las incubaciones se llevaron a cabo a los pH de 7.4 (A) y 5.2 (B). La producción de los Dioles fue mayor en incubaciones a pH 7.4, comparadas con aquellas a pH 5.2, en todo el rango de concentraciones. La Δ^4 -A y la DHT fueron también identificados como productos metabólicos de la T, pero en menor proporción. Cada punto representa el promedio \pm DE de cinco experimentos realizados por triplicado.

7.2.2 Cinética del metabolismo de la T-[¹⁴C] en la línea celular MDA-MD-231.

Cuando las células MDA-MB-231 fueron incubadas con concentraciones crecientes de sustrato (T-[¹⁴C]) por 2 hrs. (Fig. 11). No se observó incremento en la formación de Dioles, en comparación con las células MCF-7, mientras que la formación de DHT y Δ^4 -A fue baja (menor a 200 pmol/mg de proteína/h), tanto a pH 7.4 como a pH 5.2, aún cuando se incubó con la máxima concentración de sustrato (10 μ M).

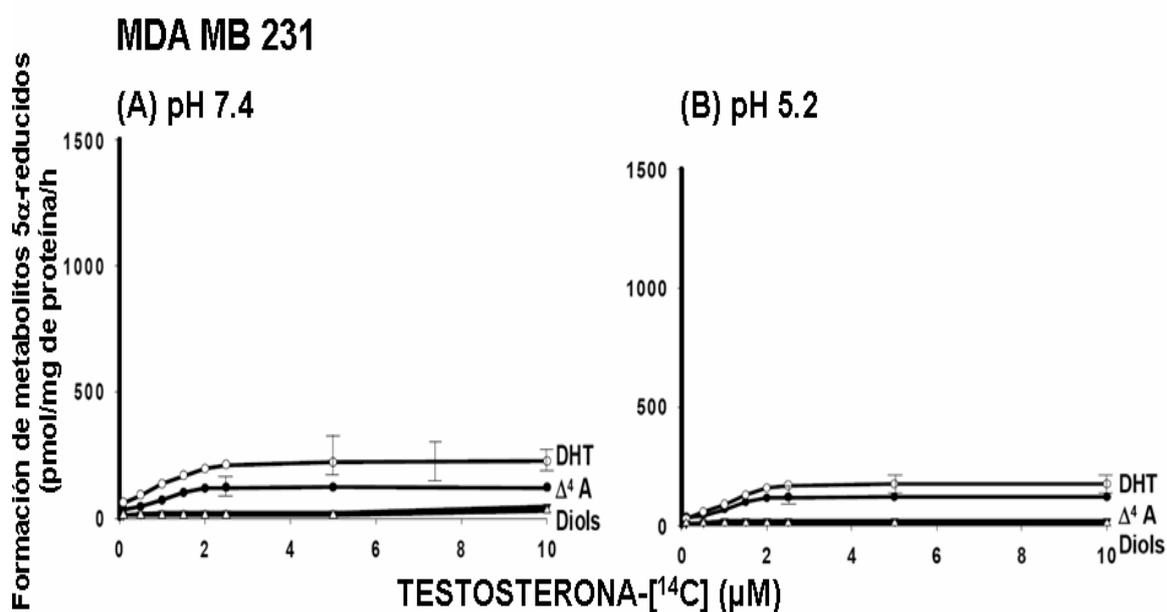


Figura 11. Bioconversión de T-[¹⁴C] a metabolitos no-fenólicos en células MDA-MB 231, en función de la concentración de sustrato, durante 2 hrs. Las incubaciones se llevaron a cabo a los pH de 7.4 (A) y 5.2 (B). La Δ^4 -A y la DHT fueron identificados como los principales productos metabólicos de la T, mientras que la formación de los Dioles fue nula a ambos pH's y en todo el rango de concentraciones de sustrato. Cada punto representa el promedio \pm DE de cinco experimentos realizados por triplicado.

7.2.3 Cinética del metabolismo de la T-[¹⁴C] en la línea celular HeLa.

Con respecto al metabolismo de T-[¹⁴C] en la línea celular de carcinoma cervical, HeLa (Fig. 12), el principal metabolito identificado fue la Δ^4 A, particularmente cuando se utilizaron altas concentraciones de sustrato (5-10 μ M). Se detectó baja formación de Dioles (25 pmol/mg de proteína/h) a pH 5.2 y nula a pH 7.4, a pesar de existir la bioconversión de T a DHT. Los patrones de la cinética del metabolismo de la T fueron diferentes cuando las células se incubaron al pH de 7.4 con respecto al de 5.2, siendo más compleja la cinética de formación de la Δ^4 -A, pues se reflejó en la producción de 1200 pmol/mg de proteína/h cuando las células se incubaron a pH 7.4, lo que puede indicar que su formación requiere de la participación de otros sistemas de enzimas, como la 17 β -Hidroxiesteroide deshidrogenasa.

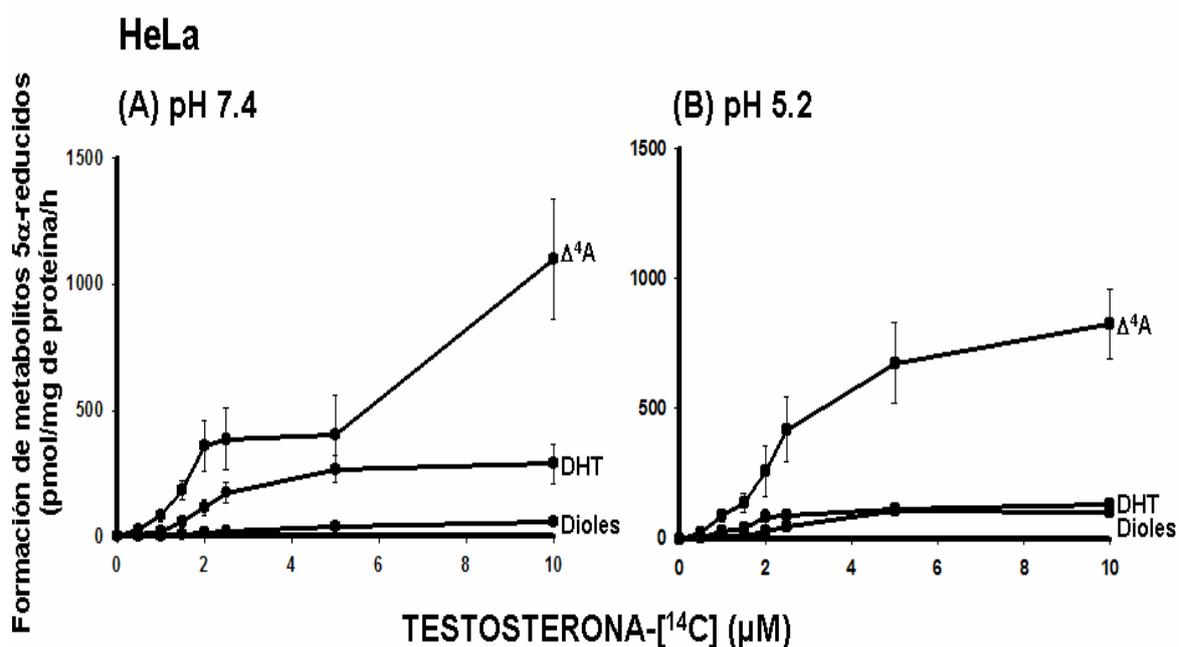


Figura 12. Bioconversión de T-[¹⁴C] a metabolitos no fenólicos en células HeLa, en función de la concentración de sustrato, durante 2 hrs. Las incubaciones se llevaron a cabo a los pH de 7.4 (A) y 5.2 (B). La Δ^4 -A fue el principal producto metabólico de la T, formándose bajas concentraciones de DHT, particularmente a pH 7.4; mientras que la formación de los Dioles fue nula a pH de 7.4 y muy baja a pH 5.2, en todo el rango de concentraciones de sustrato. Cada punto representa el promedio \pm DE de cinco experimentos realizados por triplicado.

7.3. Formación de metabolitos 5 α -reducidos de la T en las líneas celulares MCF-7, MDA MB 231 y HeLa con respecto al tiempo de incubación.

Con la finalidad de determinar los cambios en el metabolismo de la T-[¹⁴C] con respecto al tiempo (30 min a 48 h), las células se incubaron con 2 μ M de sustrato, el medio de cultivo ajustado a pH 7.4 y a 37°C (figura 13).

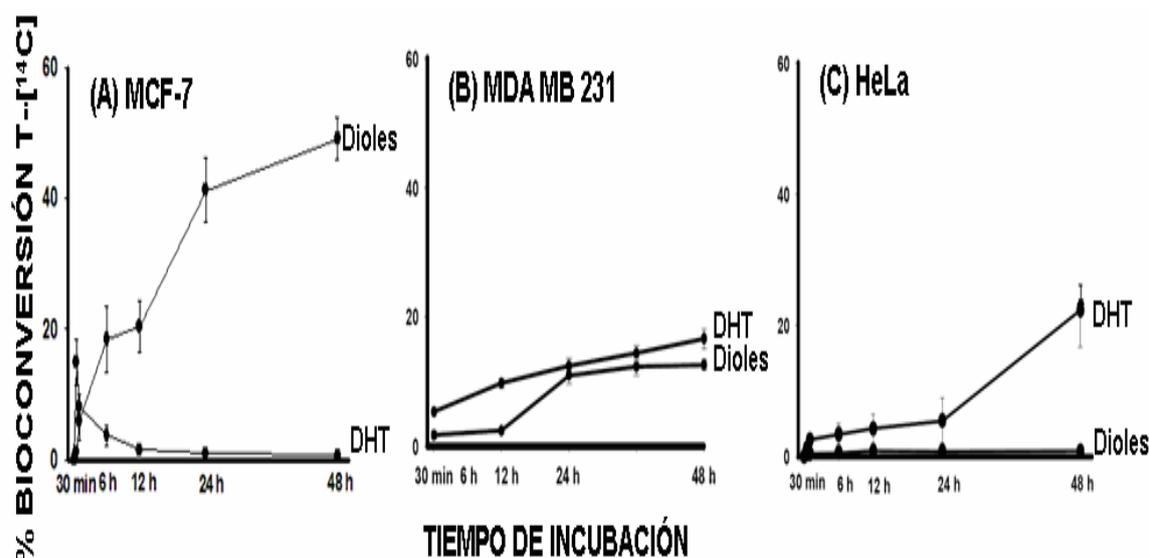


Figura 13. Formación de metabolitos 5 α -reducidos de T en células MCF-7, MDA-MB 231 y HeLa, en función del tiempo. Las incubaciones fueron llevadas a cabo usando 2 μ M de T-[¹⁴C] como el sustrato, a 37°C, pH 7.4 y a diferentes intervalos de tiempo. Una temprana (30 min.) bioconversión de T-[¹⁴C] a DHT y el posterior incremento en la formación de Dioles fue observado en células MCF-7 (A). Después de 48 hrs. de incubación, 48.3% del sustrato radiomarcado fue bioconvertido a Dioles. En las células MDA-MB 231 (B) se observa que la formación de Dioles es a tiempos más largos de incubación (24-48 hrs.). En contraste, un retardo en la formación de DHT (48 hrs.) sin la posterior bioconversión a Dioles ocurrió en células HeLa (C). Cada punto representa el promedio \pm DE de cinco experimentos en realizados por triplicado.

Los resultados demuestran que la T radiomarcada, incubada en las células MCF-7, fue extensamente bioconvertida a Dioles, presumiblemente a través de la bioconversión *a priori* a DHT, con base en las observaciones de que la máxima acumulación de DHT (aproximadamente un 20%) ocurre a los 30 min. de incubación, bajando drásticamente a las 12 hrs. (hasta un 4%) y ésta es seguida

del rápido incremento en la formación de los Dioles en forma directamente proporcional al tiempo (Fig. 13A), donde a las 48 hrs. de incubación se presenta la máxima formación de los tetrahidroreducidos, lo que representa que el 48.3% de la T-[¹⁴C] fue bioconvertida a estos metabolitos. De acuerdo con los datos de recristalización, la formación de 3 α ,5 α -Adiol y 3 β ,5 α -Adiol ocurrió en una proporción 2:1 respectivamente.

El metabolismo de la T hacia la formación de metabolitos 5 α -reducidos en las células MDA MB 231 (Fig. 13B) es lento que el de las células MCF-7, ambas derivadas de carcinoma mamario, ya que la formación de DHT y Dioles se presentó en forma considerable (mayor al 10%) hasta las 24 hrs. de incubación y se mantuvo hasta las 48 hrs., sin embargo la concentración de los Dioles se mantuvo siempre por debajo de la de DHT.

De manera contrastante, en las células HeLa no se observó la formación de Dioles, aún a las 48 hrs. de incubación, tiempo en el que incrementa la formación de DHT (Fig. 13C). Con estos experimentos no se puede descartar que las células HeLa sea incapaz de formar Dioles, sin embargo estos no son detectables al máximo tiempo de incubación estudiado.

7.4. Efecto de la inhibición de las enzimas 5 α -ERasa1 y 5 α -ERasa1 sobre el metabolismo de la T-[¹⁴C] en la línea celular MCF-7.

Con la finalidad de determinar si el metabolismo de la T para la formación de Dioles es a través de la formación de DHT como intermediario, las células MCF-7 fueron incubadas con 2 μ M de T-[¹⁴C], a 37°C, pH 7.4, por 2 h, en ausencia o presencia de 1 mM de F, potente inhibidor competitivo de las enzimas 5 α -ERasas, principalmente de la de tipo 1, aunque también bloquea parcialmente la de tipo 2.

El efecto del F sobre el metabolismo de la T en las células MCF-7 se muestra en Fig. 14, donde se observa que disminuye de 48% hasta un 5% la

producción de DHT y no hay formación de los Dioles, catabolitos 5α -reducidos de la T, permitiendo que se forme en mayor cantidad Δ^4 -A.

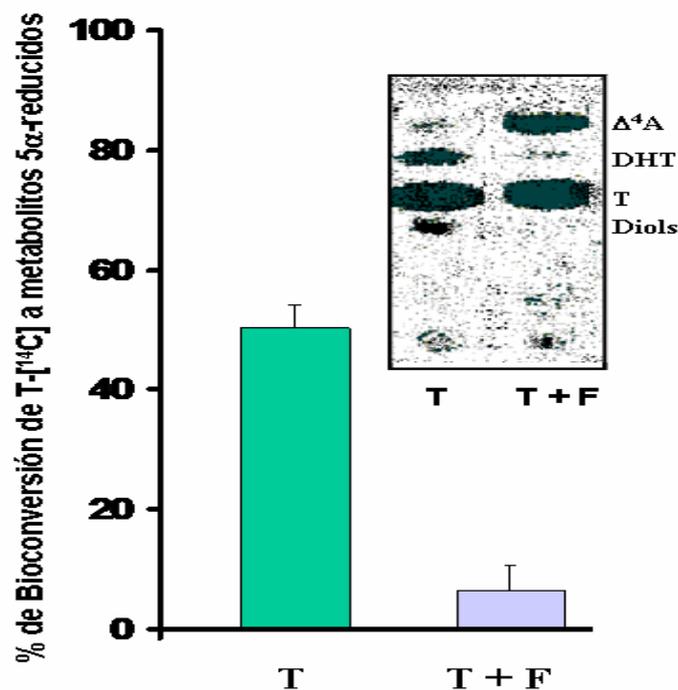


Figura 14. Metabolismo de la T-[¹⁴C] en las células MCF-7 en ausencia o presencia de 1 mM de F, inhibidor competitivo de las enzimas 5α-ERasas. Las incubaciones se llevaron a cabo con T-[¹⁴C] a 2 μM, a 37°C, pH 7.4, por 48 hrs. La adición del inhibidor disminuyó significativamente la formación de la DHT y bloqueó la formación de Dioles, permitiendo que se forme en mayor cantidad Δ⁴-A. Los resultados son expresados como el porcentaje de conversión de sustrato a metabolitos 5α-reducidos (DHT + Dioles). Los datos representan el promedio ± DE de cinco experimentos realizados por triplicado. En el recuadro se muestra la imagen representativa de una placa de cromatografía.

7.5. Expresión de las enzimas que participan en el metabolismo de la T en las líneas celulares de carcinoma mamario.

Con la finalidad de determinar si las líneas celulares de carcinoma mamario expresan las enzimas involucradas en la biosíntesis de los Diones, se procedió a analizar la síntesis de los ARN mensajeros que codifican a las enzimas SRD5A1, SRD5A2, AKR1C1 y AKR1C2 humanas, mediante la técnicas semicuantitativas de RT y PCR. Las enzimas 5α -ERasa1 y 5α -ERasa2 catalizan la biotransformación irreversible de la DHT a partir de T, mientras que la 3β -HEDasa cataliza irreversiblemente la formación del 3β -Adiol y la 3α -HEDasa la del metabolito 3α -Adiol, pero esta enzima sí puede presentar actividad reversible. Los resultados de la expresión de los genes de dichas enzimas, en las células MCF-7 y MDA-MB 231, se muestran en la figura 15.

Como era de esperarse, el nivel de expresión del ARNm-SRD5A1 fue significativamente (1.45 veces; $p < 0.05$) más alto en las células MCF-7, comparada con el de las células MDA MB 231. En contraste, la expresión del ARNm-SRD5A2 fue baja en ambas líneas celulares y no se observaron diferencias significativas. Comparando la expresión de ambas enzimas 5α -ERasas, la expresión del ARNm de la SRD5A1 fue significativamente más alta que la expresión del ARNm-SRD5A2, 4.4 veces en las células MCF-7 y 3.4 veces en las MDA-MB 231.

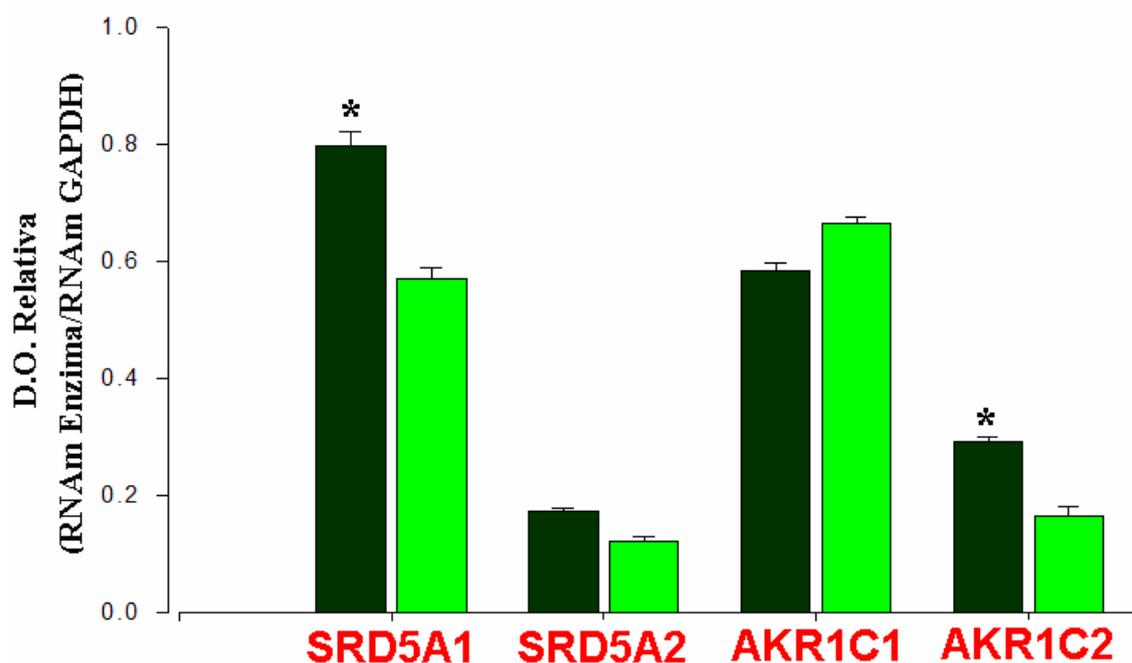


Figura 15. Niveles de expresión de los ARNm de las enzimas SRD5A1 y SRD5A2, AKR1C1 y AKR1C2 en células MCF-7 (barras oscuras) y MDA-MB-231 (barras claras). Los valores están dados como la relación de la densidad relativa para cada enzima, normalizados en función de la expresión del ARNm de G3PDH utilizado como sonda de normalización. Los datos representan el promedio \pm DE de cuatro experimentos llevados a cabo por duplicado. * $p < 0.05$.

Con respecto a la expresión de las enzimas que biotransforman DHT en los Dioles se observó que la síntesis del ARNm-AKR1C1 fue alta en ambas líneas celulares, incluso ligeramente mayor en las células MDA-MD-231, pero sin diferencias estadísticas; mientras que la síntesis del ARNm-AKR1C2 fue más alta en las células MCF-7, comparada con las MDA-MB 231. La expresión del ARNm-AKR1C1 en células MCF-7 y en células MDA-MB 231 fue significativamente más alta que el del ARNm-AKR1C2 (2.4 veces y 3.6 veces, respectivamente).

8. DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN.

Los resultados de este estudio demuestran que la línea celular de cáncer de mama humano, dependiente de estrógenos, MCF-7 puede biotransformar eficientemente la T en metabolitos no fenólicos, reducidos en el anillo A; siendo los Dioles los productos de mayor bioconversión. De forma interesante, las incubaciones de las células MCF-7 con la testosterona radiomarcada, exhibieron una gran y rápida formación de metabolitos tetrahidro-reducidos (48.3%), indicando así una alta actividad de las enzimas 5α -ERasa1 y 5α -ERasa2, así como dos miembros de la familia de las aldocetoreductasas: la 3α -HEDasa y la 3β -HEDasa. La gran conversión de T a $3\alpha,5\alpha$ -Adiol y a $3\beta,5\alpha$ -Adiol en células MCF-7 tuvo como intermediario obligatorio a la DHT, lo cual se demostró con la inhibición de la actividad enzimática de las 5α -ERasas promovida por F. Esta observación indica que para la formación de los Dioles, la enzima requiere la 5α -reducción del doble enlace localizado en el carbono 5 de la molécula de la T como primer paso metabólico.

El análisis de los resultados obtenidos coinciden con lo sugerido por Suzuki y colaboradores (2007), donde la concentración de DHT en la glándula mamaria, esta determinada por la expresión de la 5α -ERasa1, y que el efecto que pudiera ejercer la DHT depende de la presencia del RA en las células de carcinoma mamario para llevar a cabo la detención del ciclo celular, no obstante la presencia de los Dioles no es tomada en cuenta para un efecto estimulador de la proliferación.

Por otro lado, de los metabolitos tetrahidroreducidos: el $3\alpha,5\alpha$ -Adiol y el $3\beta,5\alpha$ -Adiol, obtenidos en mayor proporción en el metabolismo de las células MCF-7, pueden ser candidatos para ser esteroides de tipo estrogénico porque también demostramos que son capaces de estimular la activación transcripcional de genes regulados por estrógenos, a través del $RE\alpha$ y del $RE\beta$ (Pérez-Palacios *et al.*, 2006). Además Le Bail y colaboradores (1998) han demostrado que el $3\beta,5\alpha$ -Adiol, a una concentración muy baja (1 nM) estimula genes co-

transfectados dependientes de estrógenos, en células MCF-7 y sugieren que el $3\beta,5\alpha$ -Adiol puede estar actuando como esteroide de tipo estrogénico *in vivo*, sin embargo no han tomado en cuenta la concentración detectada (5-10 nM) en suero de mujeres postmenopáusicas (Labrie *et al.*, 1997). Ya que la capacidad de los Diones para interaccionar con el RE y, que lleven a cabo un efecto de tipo estrogénico (como la estimulación de proteínas que regulan la progresión del ciclo celular), podría deberse a la semejanza de la molécula de los Diones con la del E_2 .

Aunado a esto, sobresale la participación de la 5α -ERasa1 como una fuente de esteroides de tipo estrogénico en células MCF-7. Su expresión y actividad enzimática dependen de la concentración de T y de DHT, ya que estas dos hormonas regulan la expresión del ARNm de la enzima (Ishikawa *et al.*, 2006). También la participación de la 3α -HEDasa y de la 3β -HEDasa son esenciales para la formación de los Diones y han reportado que pueden estar reguladas por P_4 (Penning *et al.*, 2000) pero no se ha demostrado si los metabolitos 5α -reducidos podrían regular su expresión.

En contraste, las células de carcinoma mamario no dependientes de estrógenos MDA-MB 231 exhibieron una bioconversión limitada de T en metabolitos 5α -reducidos y muy poca formación de Diones, al menos en los tiempos de incubación estudiados. Lo que podría indicar que las células MDA-MB 231 no sensibles a estrógenos, expresan proporciones similares de los ARNm que codifican para las enzimas comparada con las MCF-7, pero la actividad enzimática es menor, esto puede explicarse por alguna de las siguientes hipótesis: 1) la expresión de las enzimas no es proporcional a la cantidad del ARNm transcrito puesto que modificaciones post transcripcionales generan menor cantidad de enzima en células MDA-MB 231 o 2) por la cantidad de sustrato y de cofactores disponibles en la células que son necesarios para las reacciones enzimáticas.

Por otro lado, cuando se utilizó a las células HeLa, como control experimental por tener la característica de no ser dependientes de estrógenos, se

observo que el producto de mayor bioconversión fue la delta Δ^4 -A, indicando elevada actividad de la enzima 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa. También se observó baja actividad de las 5 α -ERasas y poca actividad de la 3 α -HEDasa y 3 β -HEDasa al observarse 2% de formación de Dioles.

De forma concluyente, el resultado de una gran actividad de las enzimas 5 α -ERasas en células MCF-7, particularmente en experimentos llevados a cabo a pH 7.4, coincide con reportes de Suzuki y cols. (2001) quienes demostraron la sobreexpresión del gen SRD5A1 en tejidos de cáncer de mama humano. Además mencionan que los sistemas enzimáticos son una forma de regulación para la acción de los andrógenos, pues asocian la presencia de DHT con la expresión de la 5 α -ERasa1 y no con la 5 α -ERasa2. Nuestros resultados revelan un nivel expresión selectivamente alto del gen de SRD5A1 en células MCF-7, comparadas con las células MDA MB 231, indicando una relación proporcional entre los niveles de expresión de la enzima con la actividad en células de cáncer de mama humano. También Suzuki y cols. (2007) refieren esta forma de expresión de las enzimas con carcinomas de mama invasivos positivos para el RA y lo relacionan inversamente con el tamaño del tumor, es decir, que la DHT *per se* al tener efectos antiproliferativos, baja el riesgo de crecimiento tumoral.

Por el contrario, el hecho de que no se haya observado diferencias en la expresión de los genes AKR1C1 y AKR1C2 entre células MCF-7 y células MDA MB 231 confirman el reporte de Wiebe y cols. (2000) quienes utilizaron P₄ radiomarcada como sustrato, y demostraron una sobreexpresión y una actividad amplificada de la 5 α -ERasa1 en células MCF-7 comparado con células de mama normales no dependientes de estrógenos MCF-10A. Además Wiebe y Lewis (2003) demostraron bajos niveles de expresión de los genes de la 3 α -HEDasa y de la 3 β -HEDasa en tejidos de cáncer de mama comparados con la muestra pareada de tejido normal de la glándula mamaria. Sugiriendo que la expresión de dichas enzimas es menor comparada con el patrón de expresión en tejidos de glándula mamaria normal. No obstante, la producción de los Dioles por las células MCF-7 es grande, indicando que la cantidad del ARNm es proporcional para

producir las enzimas y cuando tienen las condiciones óptimas: como es el sustrato, cofactores (NADPH), pH y temperatura (Penning *et al.*, 2000).

El estudio de expresión de los genes que codifican para las enzimas revela que la gran formación de Diones en las células MCF-7 los cuales presentan efectos agonista de tipo estrogénico intrínseco a nivel genómico, es el resultado de una actividad local amplificada de la 5α -ERasa1 y esta puede ser explicada por la sobre-expresión del gen de la SRD5A1, atribuyéndole significado fisiopatológico importante, ya que esta producción local de metabolitos de los andrógenos pueden ejercer efectos de tipo estrogénicos intracrinicos en la misma célula, en la que su síntesis, y acción enzimática se lleva a cabo, sin una difusión hacia la circulación y sin que la célula tenga la necesidad de estrógenos directamente (Gingras *et al.*, 1999; Labrie *et al.*, 2003; Susuki *et al.*, 2005).

Aunque los Diones pueden ser inactivados por la vía de glucuroconjugación, las enzimas responsables para este proceso metabólico no ha sido caracterizado en la glándula mamaria (Labrie *et al.*, 2003). La observación está en concordancia con nuestros resultados de este estudio, en el que los metabolitos androgénicos no glucuronidos no fueron encontrados. El papel del $3\beta,5\alpha$ -Adiol en el cáncer de mama y en otras neoplasias dependientes de hormonas conlleva a una investigación subsiguiente, ya que en adición a su potente efecto agonista estrogénico mediado por ambos subtipos del RE, su bioformación en contraste con el $3\alpha,5\alpha$ -Adiol, es virtualmente irreversible (Steckelbroeck *et al.*, 2004). Por otro lado, el $3\beta,5\alpha$ -Adiol puede ejercer efectos antiproliferativos y pro-apoptóticos en células epiteliales de próstata a través de su interacción con el RE β (Weihua *et al.*, 2001; Weihua *et al.*, 2002).

Nuestros resultados implican importantes funciones intracrinicas y paracrinicas de los metabolitos 5α -reducidos de la T, por lo que, la comprensión de la actividad y expresión de los sistemas enzimáticos en los diferentes tipos y grados de cáncer de mama en mujeres mexicanas, son aspectos de relevancia para desarrollar estrategias con nuevas formulaciones que contrarresten la acción de

dichas enzimas. La producción local de esteroides sexuales activos es, parcialmente, un mecanismo que se debe tomar en cuenta para el diseño de las estrategias.

PERSPECTIVAS.

En la actualidad, se llevan a cabo experimentos para demostrar si los Diones tienen la capacidad de estimular o no, la proliferación de diferentes líneas celulares de carcinoma mamario dependiente y no dependiente de estrógenos. Pues se sugiere que los Diones pueden interaccionar con el RE y llevar a cabo la regulación de genes involucrados en la progresión del ciclo celular, por lo que se estudia el efecto de los metabolitos tetrahidroreducidos sobre la expresión de ciclina D1. Sin embargo, también relacionan al metabolito $3\beta,5\alpha$ -Adiol con efectos pro-apoptóticos por lo que se estudia su efecto en la expresión de una proteína pro-apoptótica Bax y de la proteína anti-apoptótica Bcl-2

9.- BIBLIOGRAFÍA.

Adams JB. 1998. Adrenal androgens and human breast cancer: a new appraisal. *Breast Cancer Res Treat.* 51: 183-188.

Agencia Internacional de Investigación del Cáncer (ICAR). GLOBOCAN 2002 database. <http://www-dep.iarc.fr/>. 2002].

Andersson S; Russell DW. 1990. Structural and biochemical properties of cloned and expressed human and rat steroid 5 α -reductases. *Proc Natl Acad Sci USA.* 87: 3640-3644.

Andersson S, Berman DM, Jenkins EP, Russell DW. 1991. Deletion of steroid 5 α -reductase 2 gene in male pseudohermaphroditism. *Nature.* 354: 159-161.

Ariga N, Moriya T, Suzuki T, Kimura M, Ohuchi N, Satomi S, Sasano H. 2000. 17 β -Hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and type 2 in ductal carcinoma in situ and intraductal proliferative lesions of the human breast. *Anticancer Res.* 20: 1101-1108.

Aspinall SR, Stamp S, Davison A, Shenton BK, Lennard TWJ. 2004. The proliferative effects of 5-androstene-3 β , 17 β -diol and 5 α -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.

Berardo MD, O'Connell P, Allred DC. 1996. Biological characteristics of premalignant and preinvasive breast disease. En: *Hormone-Dependent Cancer* (JR Pasqualini y BS Katzenellenbogen, Eds.) Marcel Dekker Inc, New York, Basel, Hong Kong. pp 1-17.

Birrell SN, Bentel JM, Hickey TE, Ricciardelli C, Weger MA, Horsfall DJ, Tilley WD. 1995. Androgens induce divergent proliferative responses in human breast cancer cell lines. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 52: 459-67.

Bonney RC, Reed MJ, Davidson K, Beranek PA, James VH. 1983. The relationship between 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity and oestrogen concentrations in human breast tumours and in normal breast tissue. *Clin Endocrinol.* 19: 727-739

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.

Brodie AM, Schwarzel WC, Shaikh AA, Brodie HJ. 1977. The effect of an aromatase inhibitor, 4-hydroxy-4-androstene-3,17-dione, on estrogen-dependent processes in reproduction and breast cancer. *Endocrinol.* 100: 1684-1695.

Brodie AM, Longcope C. 1980. Inhibition of peripheral aromatization by aromatase inhibitors, 4-hydroxy- and 4-acetoxy-androstene-3,17-dione. *Endocrinol.* 106: 19-21.

Brueggemeier RW, Hackett JC, Diaz-Cruz ES. 2005. Aromatase inhibitors in the treatment of breast cancer. *Endocrine Rev.* 26: 331-345.

Buzdar AU. 2002. New generation aromatase inhibitors-from the advanced to the adjuvant setting. *Breast Cancer Research and Treatment* 75: S13–S17.

Chávez BA, Vilchis F, Pérez AE, García GA, Grillasca I, Pérez-Palacios G. 1985. Stereospecificity of the intracellular binding of norethisterone and its a-ring reduced metabolites. *J Steroid Biochem.* 22: 121-126.

Clínica Mayo, 2002; Breast Cancer Facts & Figures 2000-2001. American Cancer Society, Inc. (www.cancer.org/downloads/STT/CAFF2005BrF.pdf).

Clemons M, Goss P. 2001. Estrogen and the risk of breast cancer. *N Engl J Med.* 344: 276–285.

Chomczynski P, Sacchi N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 162: 156-159.

Consejo Nacional de Población (CONAPO). 2007.

Coombes RC, Goss PE, Dowsett M, Hutchinson G, Cunningham D, Harman M, Brodie AMH. 1987. 4-hydroxyandrostenedione treatment for postmenopausal patients with advanced breast cancer. *Steroids* 50: 245-252.

Davis LG, Dibner MD, Battey JF. 1986. Basic methods in Molecular Biology. Elsevier Science Publishing Co. Inc. N Y. USA. pp 15-30, 113-140 y 189-235

Demers LM. 1994. Effects of Fadrozole (CGS 16949A) and Letrozole (CGS20267) on the inhibition of aromatase in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat.* 30: 95-102.

Dimitrakakis C, Zhou J, Bondy CA. 2002. Androgens and mammary growth and neoplasia. *Fertil Steril.* 77: S26-33.

Dufort I, Soucy P, Labrie F, Luu-The V. 1996. Molecular cloning of human type 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase that differs from 20 α -hydroxysteroid dehydrogenase by seven amino acids. *Biochem Biophys Res Commun.* 228:474-9.

Dufort I, Labrie F, Luu-The V. 2001. Human types 1 and 3 3 alpha-hydroxysteroid dehydrogenases: differential lability and tissue distribution. *J Clin Endocrinol Metab.* 86: 841-846.

Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin DM. GLOBOCAN 2000: Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide, Version 1.0. IARC Cancer Base No. 5. Lyon, IARC-Press, 2001, National Cancer Institute, 2007 (<http://www.cancer.gov/cancertopics/types/breast>).

Gingras S, Moriggl R, Groner B, Simard J. 1999. Induction of 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/ Δ^5 - Δ^4 isomerase type 1 gene transcription in human breast cancer cell lines and in normal mammary epithelial cells by interleukin-4 and interleukin-13. *J Mol Endocrinol.* 13: 66-81.

Glenn TC, Glenn SJ. 1994. Rapid elution of DNA from agarose gels using polyester plug spin insert (PEPSIs). *Trends in Genetics.* 10: 344-350.

GLOBOCAN 2002. Descriptive Epidemiology Group. IARC; <http://www-dep.iarc.fr>)

Greeve MA, Allan RK, Harvey JM, 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.

Goss PE. 1999. Risks versus benefits in the clinical application of aromatase inhibitors. *Endocrine-Rel Cancer.* 6: 325-332.

Hackenberg R, Turgetto I, Filmer A, Schulz KD. 1993. Estrogen and androgen receptor mediated stimulation and inhibition of proliferation by androst-5-ene-3 β ,17 β -diol in human mammary cancer cells. *J Steroid Biochem and Mol Biol.* 46: 597-603.

Hall JM, Lee MK, Newman B, Horrow JE, Anderson LA, Huey B, King MC. 1990. Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q 21. *Science.* 250: 1684-1689.

Honma N, Takubo K, Sawabe M, Arai T, Akiyama F, Sakamoto G, Utsumi T, Yoshimura N, Harada N. 2006. Estrogen-metabolizing enzymes in breast cancers from women over the age of 80 years. *J Clin Endocrinol Metab.* 91: 607-613.

Horwitz KB, Freidenberg GR. 1985. Growth inhibition and increase of insulin receptors in antiestrogen-resistant T47D human breast cancer cells by progestins: implication for endocrine therapies. *Cancer Res.* 45: 167-173.

INEGI. Estadísticas de Mortalidad. 2007. 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 a 5 alpha-reductase inhibitor. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 98: 133-138.

Jez JM, Bennett MJ, Schlegel BP, Lewis M, Penning TM. 1997. Comparative anatomy of the aldo-keto reductase superfamily. *J Biochem.* 15: 625-36.

Jorgensen L, Brünner N, Spang-Thomsen M, James MR, Clarke R, Dombrowsky P, Svenstrup B. 1997. Steroid metabolism in the hormone dependent MCF-7 human breast carcinoma cell line and its two hormone resistant subpopulations MCF-7/LCC1 and MCF-7/LCC2. *J Steroid Biochem and Mol Biol.* 63: 275-281.

Kelsey JL, Gammon MD, John EM. 1993. Reproductive factors and breast cancer. *Epidemiol Rev.* 15: 36-47.

Kurebayashi J. 2003. Endocrine-resistant breast cancer: underlying mechanisms and strategies for overcoming resistance. *Breast Cancer* 10:112–119.

Larrea F, Vilchis F, Chávez B, Pérez AE, Garza-Flores J, Pérez-Palacios G. 1987. The metabolism of 19-nor contraceptive progestins modulates their biological activity at the neuroendocrine level. *J Steroid Biochem.* 27: 657-663.

Labrie F, Simard J, de Launoit Y, Poulin R, Theriault C, Dumont M, Dauvois S, Martel C, Li SM. 1992. Androgens and breast cancer. *Cancer Detection Pre.* 16: 31-38.

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

Labrie F, Bélanger A, Luu-The V, Labrie C, Simard J, Cusan L, Gomez J-L, Candas B. 1998. DHEA and the intracrine formation of androgens and estrogens in peripheral target tissues: Its role during aging. *Steroids.* 63: 322-328.

Labrie F, Luu-The V, Lin SX, Simard J, Labrie C, El-Alfy M, Pelletier G, Bélanger A. 2000. Intracrinology: Role of the family of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenases in human physiology and disease. *J Mol Endocrinol.* 25: 1-16.

Labrie F, Luu-The V, Labrie C, Bélanger A, Simard J, Lin S-X, Pelletier G. 2003. Endocrine and intracrine sources of androgens in women: Inhibition of breast cancer and other roles of androgens and their precursor dehydroepiandrosterone. *Endocrine Rev.* 24: 152-182.

Larrea F, García-Becerra R, Lemus AE, García GA, Pérez-Palacios G, Jackson KJ, Coleman KM, Dace R, Smith CL, Cooney AJ. 2001. A-ring reduced metabolites of 19-nor synthetic progestins as subtype selective agonists for ER α . *Endocrinol.* 142: 3791-3799.

Le Bail JC, Marre-Fournier F, Nicolas JC, Habrioux G. 1998. C19 steroids estrogenic activity in human breast cancer cell lines: importance of dehydroepiandrosterone sulfate at physiological plasma concentration. *Steroids*. 63: 678-683

Lemus AE, Vilchis F, Damsky R, Chávez BA, García GA, Grillasca I, Pérez-Palacios G. 1992. Mechanisms of action of levonorgestrel: in vitro metabolism and specific interactions with steroid receptors in target organs. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 41: 881-890.

Lemus AE, Zaga V, Santillán R, García GA, Grillasca I, Damián-Matsumura P, Jackson KJ, Cooney AJ, Larrea F, Pérez-Palacios G. 2000. The oestrogenic effects of gestodene, a potent contraceptive progestin, are mediated by its a-ring reduced metabolites. *J Endocrinol*. 165: 693-702.

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

Liao D-ZJ, Cooley GP, Pantazis CG, Hou X, Li SA. 1998. Promotion of estrogen-induced mammary gland carcinogenesis by androgen in the male Noble rat: Probable mediation by steroid receptors. *Carcinogenesis*. 19: 2173-2180.

Liao DJ, Dickson RB. 2002. Roles of androgens in the development, growth, and carcinogenesis of the mammary gland. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 80: 175-189.

Lippman M. 1998. Endocrine-responsive cancer. In: *Williams Textbook of Endocrinology*,. Eds. JD Wilson, DW Foster, HM Kronenberg, PR Larsen. Philadelphia: W. B. Saunders Company. pp 1675-1692.

Lonning PE. 2004. Aromatase inhibitors in breast cancer. *Endocrine-Related Cancer*. 11: 179-189.

López-Ríos O, Lazcano-Ponce S, Tovar-Guzmán V, Hernández-Avila M. 1997. La epidemia de cáncer mamario en México ¿Consecuencia de la transición demográfica? *Salud Publ Méx*. 39: 259-265.

Pasqualini JR. 1993. Role of androgens in breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 45: 167-172.

Pasqualini JR y Chetrite G. 1996. Activity, regulation and expression of sulfatase, sulfotransferase, and 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase in breast cancer. In: *Hormone-Dependent Cancer*, Eds. JR Pasqualini and BS Katzenellenbogen. New York: Marcel Dekker, Inc. pp 25-80.

Penning TM, Burczynski ME, Jez JM, Hung CHF, Lin HK, Ma H, Moore M, Palackal N, Ratnam K. 2000. Human 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase isoforms

(AKR1C1–AKR1C4) of the aldo-keto reductase superfamily: functional plasticity and tissue distribution reveals roles in the inactivation and formation of male and female sex hormones. *J Biochem.* 351: 67-77.

Pérez-Palacios G, Santillán R, García-Becerra R, Borja-Cacho E, 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. *J Endocrinol.* 190:805-818.

Pike MC, Spicer DV. 1991. Endogenous estrogen and progesterone as the major determinants of breast cancer risk: Prospects for control by “natural” and “technological” means. En: *Hormonal Carcinogenesis* (JJ Li, S Nandi and SA Li, Eds.) Springer-Verlag, New York, pp 209-216.

Poulin R, Baker D, Labrie F. 1988. Androgens inhibit basal and estrogen-induced cell proliferation in the ZR-75-1 human breast cancer cell line. *Breast Cancer Res Treat.* 12: 213-225.

Primer 3: http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi.

Programa de Acción: Mujer y Salud (PROMSA) 2002-2006, Secretaría de Salud; Subsecretaría de Prevención y Protección de la Salud, México 2006. (www.generoyaludreproductiva.gob.mx/Mujer_y_Salud-CNEGSR.pdf).

Programa Nacional de Salud (PRONASA) 2001-2006, Programa de Acción: Cáncer de Mama de la Secretaría de Salud, México 2002. (www.salud.gob.mx/docprog/estrategia_3/cancer_mama.pdf).

Ragaz J. 1999. Status of aromatase inhibitors in relation to other breast cancer treatment modalities. *Endocrine-Rel Cancer.* 6: 277-291.

Russell DW, Wilson JD. 1994. Steroid 5 α -reductase: two genes/two enzymes *Annu Rev Biochem.* 63: 25-61.

Russell DW, Berman DM, Bryant JT, Cala KM, Davis DL, Landrum CP, Prihoda JS, Silver RI, Thigpen AE, Wigley WC. 1994. The molecular genetics of steroid 5 α -reductases. *Recent Prog Horm Res.* 49: 275-284.

Safe SH. 1995. Environmental and dietary estrogens and human health: is a problem? *Environ Health Persp.* 103: 346-351.

Salud: México 2004, www.mex.ops-oms.org/documentos/perfil/salud2004.pdf.

Sanger F, Coulson AR. 1975. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol.* 94: 441-448.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Biotechnol.* 24: 104-108.

Shang Y. 2006. Molecular mechanisms of oestrogen and SERMs in endometrial carcinogenesis, *Nat Rev Cancer.* 6: 360-368.

Santen RJ, Manni A, Harvey H, Redmond C. 1990. Endocrine treatment of breast cancer in women. *Endocr Rev.* 11: 221-265.

Sasano H, Frost AR, Saitoh R, Harada N, Poutanen M, Vihko R, Bulun SE, Silverberg SG, Nagura H. 1996. Aromatase and 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in human breast carcinoma. *J Clin Endocrinol Metabolism.* 81: 4042-4046.

Sasano H, Sato S, Ito K, Yajima A, Nakamura J, Yoshihama M, Ariga K, Anderson TJ, Miller WR. 1999. Effects of aromatase inhibitors on the pathobiology of human breast, endometrial and ovarian carcinoma. *Endocrin-Rel Cancer.* 6: 197-204.

Schoonen WGEJ, Joosten JWH, Kloosterboer HJ. 1995a. Effects of two classes of progestagens, pregnane and 19-nortestosterone derivatives, on cell growth of human breast tumor cells: I. MCF-7 cell lines. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 55: 423-437.

Schoonen WGEJ, Joosten JWH, Kloosterboer HJ. 1995b. Effects of two classes of progestogens, pregnane and 19-nortestosterone derivatives, on cell growth of human breast tumor cells: II. T47D cell lines. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 55: 439-444.

Somboonporn W, Davis S, Seif MW, Bell R. 2005. Testosterone for peri- and postmenopausal women. *Cochrane Database Syst Rev.* 19: CD004509.

Sonne-Hansen K, Lykkesfeldt AE. 2005. Endogenous aromatization of testosterone results in growth stimulation of the human MCF-7 breast cancer cell line. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 93: 25-34.

Suzuki T, Moriya T, Ariga N, Kaneko C, Kanazawa M, Sasano H. 2000. 17 β -Hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and type 2 in human breast carcinoma: A correlation to clinicopathological parameters. *British J of Cancer.* 82: 518-523.

Suzuki T, Darnel AD, Akahira JI, Ariga N, Keneko C, Ta Keyama J, Moriya T, Sabano H. 2001. 5 α -reductases in human breast carcinoma: Possible modulator in situ of androgenic actions. *J Clin Endocrinol Metab.* 84: 2963-2971.

Suzuki T, Miki Y, Nakamura Y, Moriya T, Ito K, Ohuchi N, Sasano H. 2005. Sex steroid-producing enzymes in human breast cancer. *Endocr Relat Cancer.* 12:701-720.

Suzuki T, Miki Y, Moriya T, Akahira J, Ishida T, Hirakawa H, Yamaguchi Y, Hayashi S, 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.

Szelei J, Jimenez J, Soto AM, Luizzi MF, Sonnenschein C. 1997. Androgen-induced inhibition of proliferation in human breast cancer MCF7 cells transfected with androgen receptor. *Endocrinol*.138: 1406-1412.

Thieulant ML, Samperez S, Jouan P. 1981. Evidence for 5 alpha-androstane-3 beta, 17 beta-diol binding to the estrogen receptor in the cytosol from male rat pituitary. *Endocrinol*. 108: 1552-1560.

Thieulant ML, Benie T, Michaud S, Klein H, Vessieres A. 1983. Binding and effects of 5 alpha-androstane-3 beta,17 beta-diol in the male rat pituitary. *J Steroid Biochem*.19: 241-246.

Van der Burg B, Kalkhoven E, Isbrücker L, de Laat SW. 1992. Effects of progestins on the proliferation of estrogen-dependent human breast cancer cells under growth factor-defined conditions. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 42: 457-465.

Wiebe JP, Muzia D, Hu J, Szwajcer D, Hill SA, Seachrist JL. 2000. The 4-pregnene and 5alfa-pregnane progesterone metabolites formed in nontumorous and tumorous breast tissue have opposite effects on breast cell proliferation and adhesion. *Cancer Res*. 60: 936-943.

Wiebe JP, Lewis MJ. 2003. Activity and expression of progesterone metabolizing 5alpha-reductase, 20alpha-hydroxysteroid oxidoreductase and 3alpha(beta)-hydroxysteroid oxidoreductases in tumorigenic (MCF-7, MDA-MB-231, T-47D) and nontumorigenic (MCF-10A) human breast cancer cells. *BMC Cancer*. 22: 1-15.

Weihua Z, Makela S, Andersson LC, Salmi S, Saji S, Webster JI, Jensen EV, Nilsson S, Warner M, Gustafsson JA. 2001. A role for estrogen receptor beta in the regulation of growth of the ventral prostate. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98:6330-6335.

Weihua Z, Lathe R, Warner M, Gustafsson JA. 2002. An endocrine pathway in the prostate, ERbeta, AR, 5alpha-androstane-3beta,17beta-diol, and CYP7B1, regulates prostate growth. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99:13589-13594.

Wing LY, Garrett WM, Brodie AM. 1985. Effects of aromatase inhibitors, aminoglutethimide, and 4-hydroxyandrostenedione on cyclic rats and rats with 7,12-dimethylbenz(a)anthracene induced mammary tumors. *Cancer Research*. 45: 2425–2428.

World Health Organization (WHO), 2007 *The World Health Report*; WHO Publications. Geneva, Switzerland.
(<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>).

Xie B, Tsao SW, Wong YC. 1999. Sex hormone-induced mammary carcinogenesis in female Noble rats: the role of androgens. *Carcinogenesis*. 20: 1597-1606.

Yager JD y Davidson NE. 2006. Estrogen carcinogenesis in breast cancer. *N Engl J Med*. 354: 270-282.

Zhou J, Ng S, Adesanya-Famuiya O, Anderson K, Bondy CA. 2000. Testosterone inhibits estrogen-induced mammary epithelial proliferation and suppresses estrogen receptor expression. *FASEB*. 14: 1725-1730.

ANEXO 1.

Parte de los resultados de la presente tesis se publicaron en “Journal of Endocrinology” en el año 2006, volumen 190, número 3, pags.: 805-818.

Es la revista oficial de la Sociedad Europea de Endocrinología y tiene un factor de impacto de **3.072**