



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS  
AVANZADOS DEL INSTITUTO  
POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE  
FARMACOLOGÍA

**“Expresión del canal EAG1 y receptores a estrógenos en  
útero y cérvix de ratones hembra ovariectomizadas tratadas  
con tamoxifeno.”**

**T E S I S**

Que presenta

**Enf. DIANA EMILCE ALVAREZ SUAREZ**

Para obtener el grado de

**MAESTRA EN CIENCIAS  
EN LA ESPECIALIDAD DE FARMACOLOGÍA**

Director de la tesis: Dr. Francisco Javier Camacho Arroyo

México, D.F.

DICIEMBRE, 2014

**Este trabajo se llevó a cabo en el laboratorio 13 del Departamento de Farmacología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección y tutoría del Dr. Francisco Javier Camacho Arroyo.**

**Proyecto apoyado parcialmente a través del donativo 141126 del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).**

**Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca No. 514093 otorgada durante la realización mis estudios de maestría.**

## **AGRADECIMIENTOS**

Doy gracias a todas aquellas personas que han hecho parte de mi camino y me han ayudado a crecer.

A mi familia por creer en mí y permitirme volar. Aunque estén lejos siempre están presentes en mi corazón.

A Humberto por el bonito amor que me ha brindado y recordarme que aunque pueden haber muchos obstáculos, la lucha constante nos permite alcanzar nuestras metas.

A todos mis compañeros y amigos de generación por hacerme sentir en casa, espero que en un futuro coincidamos y obtengan hermosas vivencias en sus caminos.

Al Dr. Javier Camacho por su apoyo, conocimiento y consejos que me permitieron avanzar en el desarrollo de este proyecto; además por su gran paciencia durante las revisiones de este trabajo.

A mis sinodales por sus valiosos aportes que me permitieron mejorar el desarrollo de mi trabajo.

A mis amigas del laboratorio 13 que me apoyaron en todo momento y con quienes compartí gratos momentos, espero que continuemos siendo tan unidas como lo somos ahora.

A Eunice Vera, Elizabeth Hernández y Guadalupe Montiel por su apoyo técnico y amistad en el desarrollo de este proyecto.

A todos Gracias.

## ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	3
1. INTRODUCCIÓN.....	5
GENERALIDADES.....	5
1.1 ANATOMÍA Y FISIOLOGÍA DE LA GLÁNDULA MAMARIA:.....	5
1.2 ANATOMÍA Y FISIOLOGÍA DEL ÚTERO.....	6
1.3. FUNCIONES DE LOS ESTRÓGENOS EN LA MUJER.....	8
1.4 MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS ESTRÓGENOS.....	10
1.5 CÁNCER DE MAMA.....	11
1.5.1 FACTORES DE RIESGO PARA EL DESARROLLO DEL CÁNCER DE MAMA.....	12
1.5.2 TIPOS DE CÁNCER DE MAMA.....	12
1.5.3 RECEPTORES DE ESTRÓGENOS Y CÁNCER DE MAMA....	13
1.5.4 TERAPIA HORMONAL CON TAMOXIFENO PARA CÁNCER DE MAMA.....	14
1.5.4.1 MECANISMO DE ACCIÓN DEL TAMOXIFENO.....	14
1.5.4.2. EFECTOS SECUNDARIOS DEL TAMOXIFENO.....	15
1.6 PAPEL DE LOS CANALES DE POTASIO EN LA PROLIFERACIÓN CELULAR.....	16
2. JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS.....	20
2.1 JUSTIFICACIÓN.....	20
2.2 HIPÓTESIS.....	20

3. OBJETIVOS.....	21
3.1 OBJETIVO GENERAL .....	21
3.2 OBJETIVOS PARTICULARES .....	21
4. METODOLOGÍA .....	22
4.1 MODELO ANIMAL .....	22
4.1.2 OVARIECTOMÍA.....	22
4.1.3 DETERMINACIÓN DE LA FASE DEL CICLO ESTRAL.....	23
4.1.4 CONTROL DE PESO.....	24
4.1.5 TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO.....	24
4.2 ANÁLISIS DE ÓRGANOS.....	24
4.2.1 TINCIÓN DE HEMATOXILINA EOSINA .....	25
4.2.2. INMUNOHISTOQUÍMICA. ....	25
4.3 DETERMINACIONES DE BIOLOGÍA MOLECULAR .....	27
4.3.1 EXTRACCIÓN DE RNA Y SÍNTESIS DE cDNA. ....	27
4.3.2 PCR EN TIEMPO REAL .....	27
4.3.3 DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES PROBLEMA .....	29
4.3.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO: .....	30
5. RESULTADOS.....	31
5.1 CAMBIOS GENERADOS POR LA OVARIECTOMÍA .....	31
5.1.1 FASES DEL CICLO ESTRAL EN RATONAS CONTROL Y CON OVARIECTOMÍA.....	31

5.1.2 PESO Y TAMAÑO DEL ÚTERO EN RATONAS CONTROL Y TRATADAS.....	32
5.1.3 CAMBIOS HISTOLÓGICOS EN EL ÚTERO Y EL CÉRVIX DE RATONES HEMBRA TRATADAS CON TAMOXIFENO. ....	33
5.2 EXPRESIÓN DEL CANAL EAG1 EN CÉRVIX. ....	34
5.2.1 EXPRESIÓN RELATIVA DE mRNA de EAG1 POR PCR TIEMPO REAL Y DE LA PROTEÍNA POR INMUNOHISTOQUÍMICA EN CÉRVIX. ....	34
5.3 EXPRESIÓN DEL CANAL EAG1 EN EL ÚTERO.....	36
5.3.1 EXPRESIÓN RELATIVA DEL mRNA de EAG1 POR PCR TIEMPO REAL Y DE LA PROTEÍNA POR INMUNOHISTOQUÍMICA EN EL ÚTERO. ....	36
5.4 EXPRESIÓN DEL RECEPTOR DE ESTRÓGENOS ALFA EN EL CÉRVIX. ....	38
5.4.1 EXPRESIÓN RELATIVA DE mRNA DEL RECEPTOR DE ESTRÓGENOS ALFA POR PCR TIEMPO REAL Y DE LA PROTEÍNA POR INMUNOHISTOQUÍMICA EN EL CÉRVIX. ....	38
5.5 EXPRESIÓN DEL RECEPTOR DE ESTRÓGENOS ALFA EN EL ÚTERO. ....	40
5.5.1 EXPRESIÓN RELATIVA DE mRNA DEL RECEPTOR DE ESTRÓGENOS ALFA POR PCR TIEMPO REAL Y DE LA PROTEÍNA POR INMUNOHISTOQUÍMICA EN EL ÚTERO. ....	40
5.6 EXPRESIÓN DEL RECEPTOR DE ESTRÓGENOS BETA EN EL CÉRVIX. ....	42
5.6.1 EXPRESIÓN RELATIVA DE mRNA DEL RECEPTOR DE ESTRÓGENOS BETA POR PCR TIEMPO REAL Y DE LA PROTEÍNA POR INMUNOHISTOQUÍMICA EN EL CÉRVIX. ....	42
5.7 EXPRESIÓN DEL RECEPTOR DE ESTRÓGENOS BETA EN EL ÚTERO. ....	44

5.7.1 EXPRESIÓN RELATIVA DE mRNA DEL RECEPTOR DE ESTRÓGENOS BETA POR PCR TIEMPO REAL Y DE LA PROTEÍNA POR INMUNOHISTOQUÍMICA EN EL ÚTERO.....	44
6. DISCUSIÓN.....	46
7. CONCLUSIÓN.....	51
8. PERSPECTIVAS .....	52
9. REFERENCIAS .....	53
10. REFERENCIAS DE INTERNET.....	60

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Morfología de la glándula mamaria.....	6
Figura 2. Morfología del útero y estructuras asociadas .....	7
Figura 3. Efecto de los estrógenos en órganos femeninos .....	9
Figura 4. El mecanismo de acción de los estrógenos puede ser genómico y no genómico .....	11
Figura 5. Mecanismo de acción de los SERMs.....	15
Figura 6. Distribución del canal de potasio EAG1, en tejido normal y tumoral.....	17
Figura 7. Papel del canal EAG1 en el crecimiento celular y la progresión tumoral.....	18
Figura 8. Southern Blot de EAG1 en muestras cervicales..	19
Figura 9. Frotis vaginales y representación de las diferentes etapas del ciclo estral.....	32
Figura 10. Ganancia de peso en ratonas.....	32
Figura 11. Tamaño de úteros de ratonas.....	33
Figura 12. Tinción de Hematoxilina-Eosina del cérvix y útero .....	34
Figura 13. Expresión de mRNA de EAG1 en cérvix.....	35
Figura 14. Expresión de EAG1 en cérvix.....	35
Figura 15. Expresión de mRNA de EAG1 en el útero .....	36
Figura 16. Expresión de EAG1 en útero .....	37
Figura 17. Expresión de mRNA de ER $\alpha$ en el cérvix .....	38
Figura 18. Expresión de ER $\alpha$ en cérvix.....	39
Figura 19. Expresión de mRNA de ER $\alpha$ en útero .....	40

Figura 20. Expresión de ER $\alpha$ en el útero.....	41
Figura 21. Expresión de mRNA de ER $\beta$ en el cérvix. ....	42
Figura 22. Expresión de ER $\beta$ en cérvix.....	43
Figura 23. Expresión de mRNA de ER $\beta$ en el útero.....	44
Figura 24. Expresión de ER $\beta$ en útero.....	45

## RESUMEN

**INTRODUCCIÓN:** El cáncer de mama es el tipo de cáncer más frecuente en las mujeres y es el que mayor mortalidad presenta; dentro del tratamiento de este tipo de cáncer está la hormonoterapia, y uno de los principales fármacos usados es el tamoxifeno que es un modulador de los receptores de estrógenos. El tamoxifeno actúa como antagonista de los receptores en la mama, inhibiendo la transcripción y el crecimiento tumoral, sin embargo este fármaco a pesar de ser efectivo en el tratamiento del cáncer de mama tiene efectos adversos en el endometrio ya que actúa como agonista de los receptores de estrógenos y es considerado como un factor de riesgo para el desarrollo del cáncer de endometrio. Este efecto adverso del tamoxifeno en el endometrio es diferente en la premenopausia y la postmenopausia ya que hay variación de la concentración endógena de estrógenos, de tal forma que los efectos agonistas del tamoxifeno son mayores en la postmenopausia donde la concentración endógena de estrógenos es menor, por tal motivo los efectos adversos en el útero se presentan en las mujeres postmenopáusicas. En recientes estudios se ha demostrado que el canal de potasio EAG1 está relacionado con la oncogénesis y la progresión tumoral, ya que su expresión está limitada en tejidos normales y está aumentada en tejidos tumorales, se ha observado que se puede asociar como un marcador temprano de cáncer, además es modulado por los estrógenos y el tamoxifeno. Es de gran importancia determinar este canal EAG1 en el cérvix y el útero para evaluar la posibilidad de este como indicador de riesgo en el útero y el cérvix cuando hay exposición a tamoxifeno. **OBJETIVO:** Determinar la expresión del canal EAG1 y los receptores de estrógenos alfa ( $ER\alpha$ ) y beta ( $ER\beta$ ), en muestras de cérvix y útero de ratones hembra ovariectomizadas que recibieron tamoxifeno por 3 meses. **METODOLOGÍA:** Se estudió el efecto del tamoxifeno en el útero y el cérvix y la expresión del canal EAG1 a través de un modelo *in vivo* utilizando ratones ovariectomizadas de la cepa Balb/c, bajo tratamiento de tamoxifeno por tres meses. Posteriormente al tratamiento se

sacrificaron los animales y se estudiaron el útero y el cérvix para evaluar la expresión de EAG1, y los receptores de estrógenos alfa y beta (ER $\alpha$  y ER $\beta$ ) por PCR tiempo real e inmunohistoquímica. **RESULTADOS:** El tamoxifeno generó hiperplasia en el útero e inflamación en el cérvix, y aumentó la expresión del canal de potasio EAG1 en el útero, mientras que disminuyó la expresión del mRNA de EAG1 en el cérvix. De igual forma se presentó una alta expresión de los receptores de estrógenos alfa en ambos tejidos y muy poca expresión de los receptores de estrógenos beta. **CONCLUSIÓN:** El canal EAG1 puede ser un indicador de riesgo en el útero cuando hay exposición a tamoxifeno en condiciones hipoestrogénicas, por ejemplo en la postmenopausia. Probablemente el efecto modulador del tamoxifeno se da principalmente a través de los receptores de estrógenos alfa.

## ABSTRACT.

**INTRODUCTION:** Breast cancer is the most common type of cancer in women, displaying the highest mortality from cancer. The treatment of this cancer is hormonal therapy, and one of the main drugs used is tamoxifen which is a selective estrogen receptor modulator (SERM). Tamoxifen acts as an antagonist estrogen receptor in the breast, inhibiting transcription and tumor growth. However, this drug exerts adverse effects in the endometrium, where it acts as an estrogen receptor agonist and increases the risk of endometrial cancer. The risk of endometrial cancer is different in premenopausal and postmenopausal women because the effect of tamoxifen varies with the estrogen concentration. It functions as an estrogen agonist only in postmenopausal women with low estrogen concentration and thus may cause endometrial cancer. Recent studies have shown that the potassium channel Eag1 (ether à-go-go) is linked to oncogenesis and tumor progression. EAG1 expression shows restricted distribution in normal tissues and is increased in tumor tissue. Eag1 is suggested as an early cancer marker and is modulated by estrogen and tamoxifen. It is very important to determine Eag1 expression in the cervix and uterus to investigate the possibility of such expression as a risk indicator of cancer in the uterus and cervix when exposed to tamoxifen.

**AIM:** To determine the expression of Eag1 channel and estrogen receptors alpha (ER $\alpha$ ) and beta (ER $\beta$ ) in the cervix and uterus of ovariectomized female mice receiving tamoxifen for 3 months. **METHODS:** The effect of tamoxifen in the uterus and cervix and Eag1 channel expression was studied in an *in vivo* model of ovariectomized Balb/c mice, treated with tamoxifen for three months. Following treatment, we assessed the protein and mRNA expression of Eag1, ER $\alpha$  and ER $\beta$  in the uterus and the cervix by immunohistochemistry and RT-PCR, respectively. **RESULTS:** Tamoxifen caused uterus hyperplasia, and increased EAG1 expression in the uterus, whereas decreased mRNA of EAG1 expression in the cervix. The expression of ER $\alpha$  in both tissues was

high and the expression of ER $\beta$  was very low. **CONCLUSION:** Eag1 expression might be a risk indicator in uterus under tamoxifen exposure in hypoestrogenic conditions, for instance in postmenopause. Probably the modulating effect of tamoxifen occurs primarily through the ER $\alpha$ .

# 1. INTRODUCCIÓN

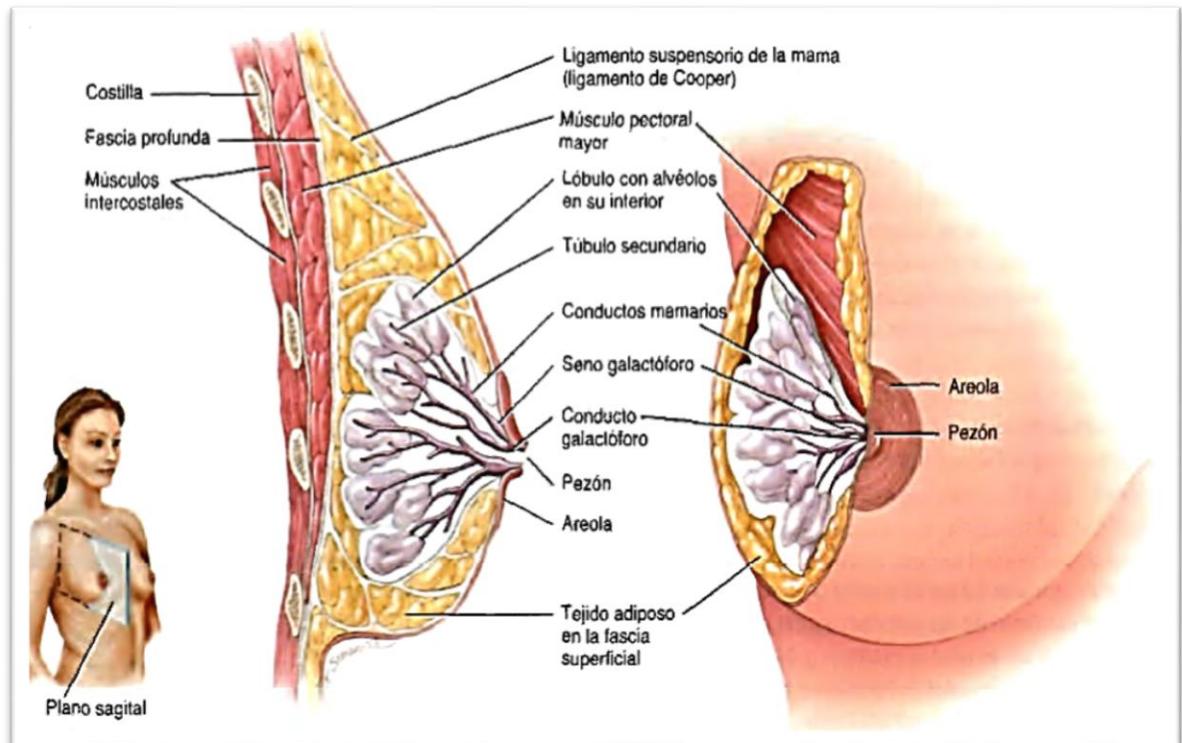
## GENERALIDADES

### 1.1 ANATOMÍA Y FISIOLOGÍA DE LA GLÁNDULA MAMARIA:

Las mamas son proyecciones semiesféricas de tamaño variable, situadas por delante de los músculos pectoral mayor y serrato anterior; cada mama tiene una proyección pigmentada denominada pezón que posee las aberturas de los conductos galactóforos por donde sale la leche (Pandya and Moore 2011) (Figura 1).

Dentro de cada mama se encuentra la glándula mamaria que se encarga de la producción de leche, cada glándula mamaria está formada por 15 a 20 lóbulos o compartimientos separados por una cantidad variable de tejido adiposo; en cada lóbulo existen varios compartimientos pequeños denominados lobulillos que se componen por alvéolos (glándulas secretoras) y la contracción de las células mioepiteliales que rodean los alvéolos expulsa la leche hacia el pezón a través de los conductos (Tortora 2011).

Las funciones de la glándula mamaria son la síntesis, la secreción y la eyección de la leche, funciones que se asocian al embarazo y parto, la producción de la leche es estimulada por la hormona prolactina secretada por la adenohipófisis, con ayuda de la progesterona y los estrógenos y la eyección de la leche se estimula por la oxitocina liberada por la neurohipófisis en respuesta a la succión del pezón de la madre por parte del lactante (Hall 2011).



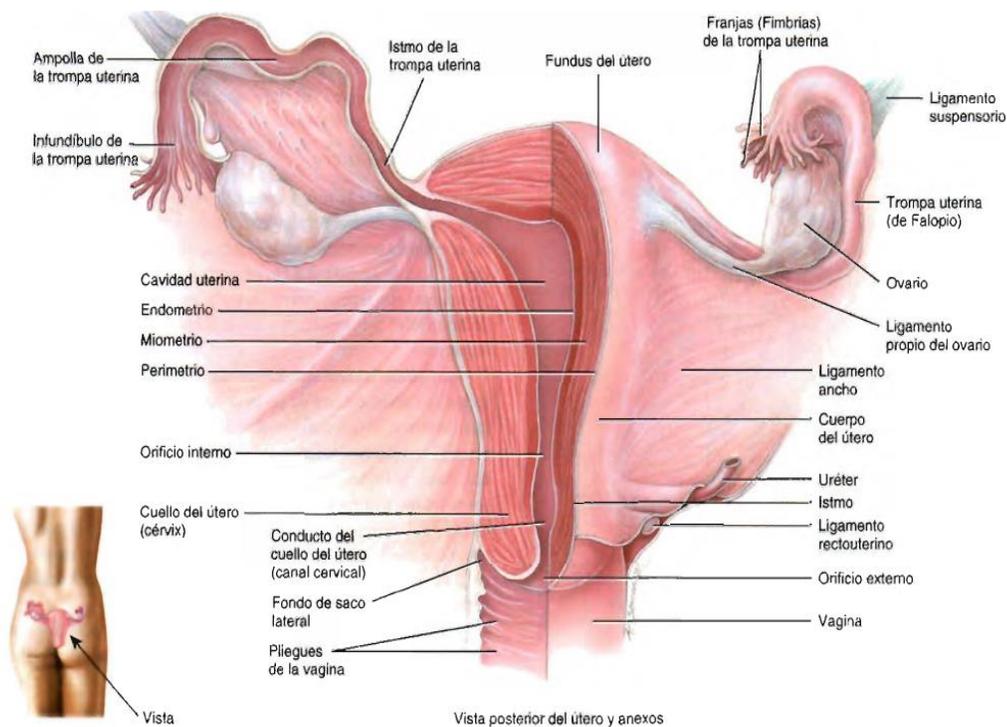
**Figura 1. Morfología de la glándula mamaria.** Un corte en el plano sagital muestra la morfología de la mama en donde se observa en el exterior el pezón rodeado por una coloración oscura denominada areola, la prominencia de las mamas la da el tejido graso que rodea a la glándula mamaria ubicada dentro de la mama y está conformada por lóbulos y conductos. Tomado de Tortora (2011).

## 1.2 ANATOMÍA Y FISIOLÓGÍA DEL ÚTERO

El útero es un órgano situado entre la vejiga urinaria y el recto, tiene el tamaño y la forma de una pera invertida en las mujeres que nunca han estado embarazadas, mide alrededor de 7,5 cm de largo, 5 cm de ancho y 2,5 cm de espesor. Las subdivisiones anatómicas del útero son: fondo uterino (porción con forma de cúpula encima de las trompas uterinas o de Falopio), cuerpo (porción central estrecha) y cuello o cérvix, (porción inferior angosta que se abre hacia la vagina) (Tortora 2011) (Figura 2). Los tipos de tejido presentes en el útero son perimetrio (capa externa) que está compuesta por epitelio plano simple y tejido conectivo areolar; miometrio (capa media muscular) que está formada por tres capas musculares lisas, y

endometrio (capa interna del útero) que se encuentra altamente vascularizado y se compone de epitelio cilíndrico simple, estroma endometrial y glándulas endometriales que aparecen como invaginaciones del epitelio luminal. (Gisela, Hemming et al.,1998)

El útero funciona como ruta que siguen los espermatozoides para fecundar el óvulo; cuando hay fecundación, el útero es el sitio de implantación del óvulo fecundado y de desarrollo del feto durante el embarazo y parto. Durante los ciclos reproductivos donde la implantación no se produce, este órgano es el sitio de origen del flujo menstrual (Tortora 2011)



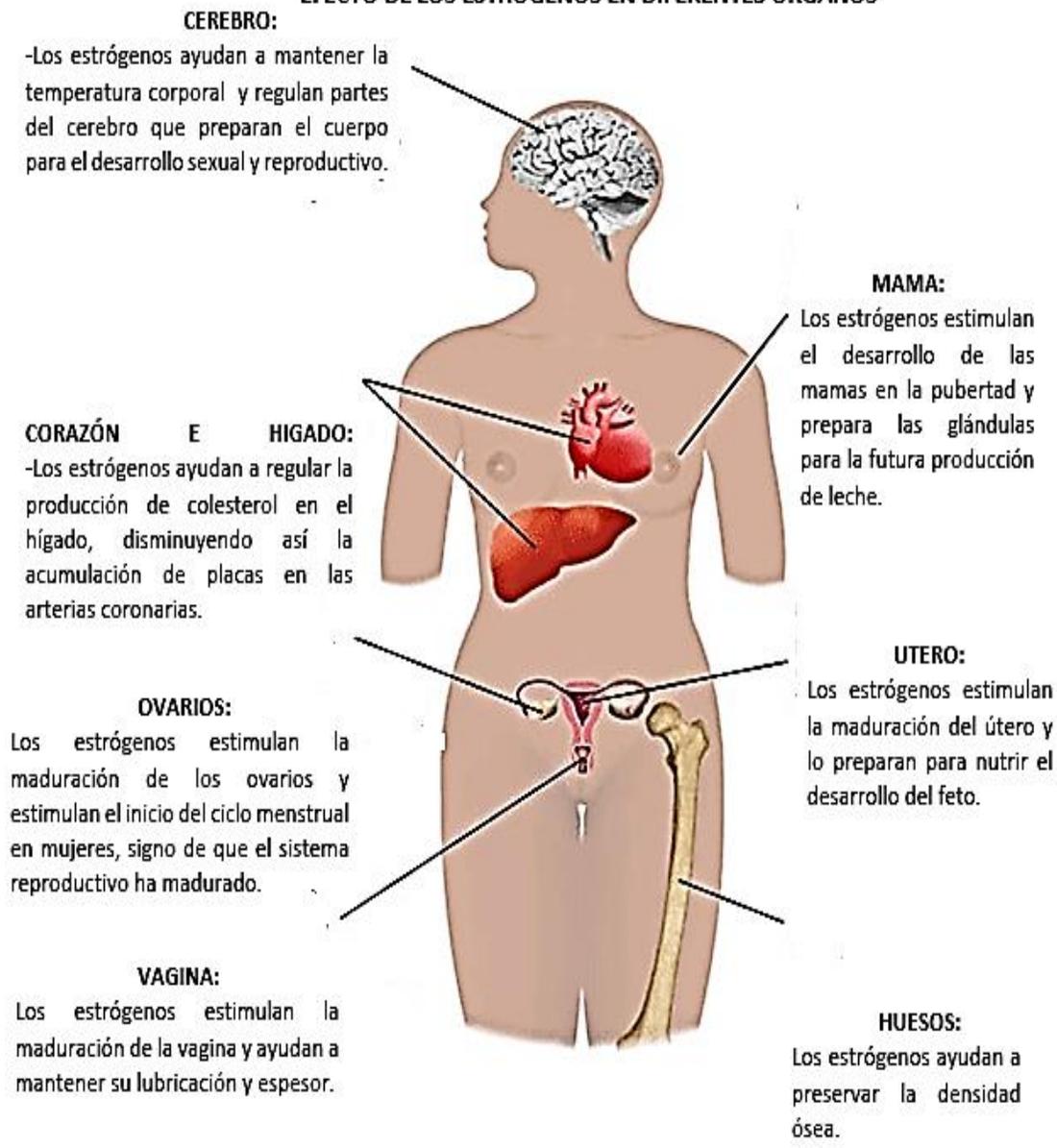
**Figura 2. Morfología del útero y estructuras asociadas.** Se observan las diferentes secciones del útero y su extensión hacia los ovarios a través de las trompas uterinas. Un corte del tejido permite observar las diferentes capas uterinas desde el exterior empezando por perimetrio, en seguida el miometrio y finalmente el endometrio que se encuentra hacia la cavidad uterina. Tomado de Tortora (2011).

### **1.3. FUNCIONES DE LOS ESTRÓGENOS EN LA MUJER**

Los estrógenos son hormonas esteroideas que se producen principalmente en las células tecaes y granulares de los ovarios aunque también se pueden producir en la placenta, la mama, los huesos, la piel, los vasos sanguíneos, las células adiposas mesenquimales y el cerebro (Gruber, Tschugguel et al., 2002). En los ovarios, las células tecaes secretan andrógenos que se difunden a las células granulosas para ser transformadas en estrógenos por medio de la enzima aromatasa (Hillier, Whitelaw et al., 1994); Durante la pubertad, la producción de dichas hormonas, presenta un aumento y sus niveles varían durante el ciclo menstrual, de tal forma que la mayor concentración de estrógenos se presenta durante el periodo preovulatorio y la menor concentración de estrógenos se da justo antes de la menstruación. Este efecto cambia durante la menopausia ya que hay una depleción de folículos ováricos, lo que lleva a una gran disminución en la producción de estrógenos ováricos disminuyendo su concentración en suero y su principal producción se va a dar por la conversión extragonadal de testosterona a estrona. (Gruber, Tschugguel et al., 2002)

Las acciones de los estrógenos son promover el desarrollo y mantenimiento de las estructuras reproductoras femeninas, de los caracteres sexuales secundarios como los son la distribución del tejido adiposo en la mama, el abdomen, el monte del pubis y las caderas, el tono de voz, la pelvis ancha y el patrón de crecimiento de pelo en la cabeza y cuerpo, (Tortora 2011) y aunque su principal acción se enfoca en los órganos reproductores también tienen efectos en el sistema cardiovascular, el esquelético y el neurológico (Gruber, Tschugguel et al., 2002), como se pueden observar en la figura 3.

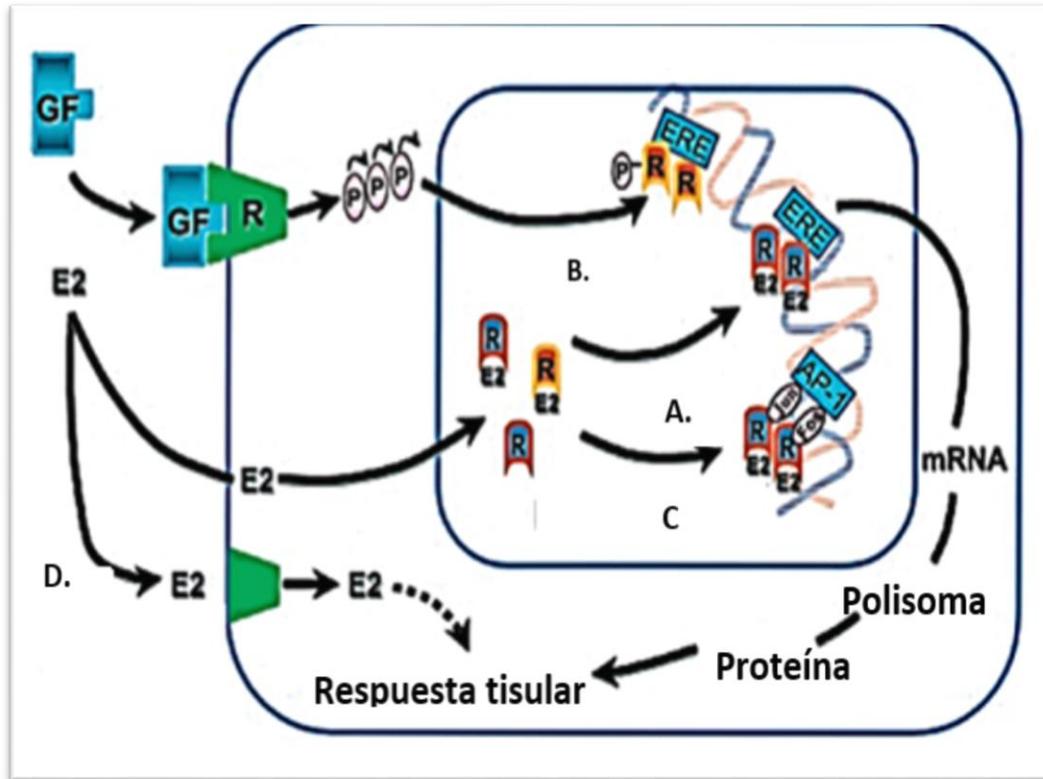
### EFFECTO DE LOS ESTRÓGENOS EN DIFERENTES ORGANOS



**Figura 3. Efecto de los estrógenos en órganos femeninos.** Los estrógenos tienen funciones en diferentes órganos reproductores femeninos y en huesos favoreciendo la densidad ósea, y en hígado y corazón donde disminuye la producción de colesterol y la formación de placas arteriales. Tomado y modificado de <http://www.urmc.rochester.edu/Encyclopedia/GetImage.aspx?ImageID=125600>

#### **1.4 MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS ESTRÓGENOS.**

El efecto de los estrógenos (17 $\beta$ -Estradiol) se da por cuatro vías (Hall, Couse et al., 2001) (Figura 4), la primera de estas es la vía genómica que es mediada principalmente por receptores nucleares denominados receptores de estrógenos (ER), conformados por tres dominios funcionales: el amino terminal (NH<sub>2</sub>), el dominio de unión a DNA y el dominio de unión al ligando (Nilsson, Mäkelä et al., 2001). La unión del ligando al ER desencadena cambios conformacionales en el receptor, que llevan a su dimerización, interacción con Elementos de Respuesta a Estrógenos en el DNA (EREs) y reclutamiento de proteínas coactivadoras que generan cambios en la tasa de transcripción de genes (McKenna, Lanz et al. 1999), (Katzenellenbogen and Katzenellenbogen 1996). La segunda vía de acción es la activación de ER independiente de ligando, en este caso, la activación de los receptores es independiente de la presencia de estrógenos en el medio, y aunque no está claramente definido el mecanismo de acción se ha encontrado que en presencia de factores de crecimiento se activan receptores de membrana y se desencadena la vía de las MAPK (mitogen-activated protein Kinases) que tras varias fosforilaciones activan al ER nuclear y permiten su interacción con EREs en el DNA para promover la transcripción de genes (Kato 2001). La tercera vía es la activación genómica de ER independiente de EREs, en la cual los ER activados por estrógenos, interactúan con las proteínas Fos y Jun uniéndose a la Proteína Activadora-1 (AP-1) que es un factor de transcripción relacionado con la proliferación celular (Hall, Couse et al. 2001). Finalmente en la vía no genómica la activación de la señalización es iniciada en la membrana celular a través de una pequeña población de receptores que enlazan estrógenos y activan proteínas G desencadenando vías de señalización que llevan a la proliferación celular (Pedram, Razandi et al., 2002).



**Figura 4. El mecanismo de acción de los estrógenos puede ser genómico y no genómico.** Los mecanismos de acción que se describen son **A. Vía clásica o dependiente de ligando**, en esta vía el complejo estrógenos- Receptor (E2-ER) se enlaza a los Elementos de Respuesta a Estrógenos (ERE) en los promotores blanco regulando la transcripción de genes y su respuesta en diferentes tejidos. **B. Vía independiente del ligando**, en esta vía los factores de crecimiento (GF) activan vías de señalización a través de cinasas que fosforilan y activan los receptores de estrógenos y estos se enlazan a los ERE regulando la transcripción. **C. Independiente de ERE:** la unión de los estrógenos a los receptores de estrógenos alteran la transcripción de genes a través de elementos de respuesta AP-1, asociado a las proteínas Jun Y Fos, lo que lleva a la regulación de la alta de la expresión de genes. **D. Vía no genómica**, en esta vía los estrógenos activan sitios de unión en la membrana celular que genera respuesta rápida en diferentes tejidos. Tomado y modificado de Hall, J. M., et al., (2001).

## 1.5 CÁNCER DE MAMA

El cáncer de mama se define como un tumor maligno que inicia en las células de la mama; este tumor se forma de células que pueden invadir tejidos cercanos o extenderse a diferentes áreas del cuerpo (Girish 2014). Este tipo de cáncer es frecuente en mujeres a nivel mundial, según datos del GLOBOCAN esta enfermedad representa una incidencia del 23% en la

población femenina y es la causa más común de muertes por cáncer, en México las estadísticas siguen esta tendencia, ya que en mujeres el cáncer de mama representa el 21.2% de todos los casos de cáncer, y la mortalidad es de 13.2% (WHO 2008)

### **1.5.1 FACTORES DE RIESGO PARA EL DESARROLLO DEL CÁNCER DE MAMA**

Dentro de los factores de riesgo para el desarrollo del cáncer de mama están: pertenecer al género femenino, historia familiar con cáncer mamario, mutaciones en los genes BRCA1 Y BRCA2, edad mayor de 40 años, presencia de algunas lesiones benignas previas en mama, menarquia temprana y menopausia tardía, consumo de anticonceptivos orales, inicio de la maternidad a edades tardías, consumo de alcohol, obesidad, sedentarismo y estilos de vida, entre otros (Girish 2014).

### **1.5.2 TIPOS DE CÁNCER DE MAMA**

Existen muchos tipos de cáncer de mama y se relacionan con su grado de invasión y con la localización del tumor, los más frecuentes son: *Carcinoma ductal in situ*: es un tipo de cáncer no invasivo o de las células que rodean los ductos. *Carcinoma ductal infiltrante*: en este tipo de cáncer las células cancerosas atraviesan las paredes de los ductos e invaden el tejido graso de las mamas y puede hacer metástasis a otros órganos. *Carcinoma lobular in situ*: Es un tipo de cáncer no invasivo que inicia en las células de los lóbulos de las mamas. *Carcinoma lobular infiltrante*: se origina en los lóbulos donde se produce la leche, las células cancerosas pueden migrar fácilmente a otros órganos del cuerpo (Peepliwal and Tandale 2013).

### **1.5.3 RECEPTORES DE ESTRÓGENOS Y CÁNCER DE MAMA.**

El desarrollo de cáncer de mama tiene un factor hormonal implicado, particularmente, los estrógenos se han establecido como un factor de riesgo para el desarrollo de cáncer de mama (Toniolo, Levitz et al., 1995), sumado a esto se ha encontrado aumentada la expresión de receptores de estrógenos en lesiones malignas y premalignas de mama (Sommer and Fuqua 2001).

Se ha encontrado que la interacción de estrógenos con ER puede resultar en un aumento de la proliferación en células de la mama (Pearce and Jordan 2004), y se ha demostrado que aumentan directamente el crecimiento de líneas celulares de cáncer de mama en cultivos celulares llevándolas de la fase G del ciclo celular a la fase S (Doisneau-Sixou, Sergio et al., 2003).

El mecanismo por el cual los estrógenos están relacionados con el cáncer de mama podría ser la inducción de proteínas reguladoras que funcionan como factores de crecimiento autocrinos, paracrinos o intracrinos (Dickson and Lippman 1995), sin embargo, los genes responsables de los efectos mitogénicos de los estrógenos no se han establecido claramente ya que incluyen la regulación de diferentes factores de crecimiento, proteasas, ciclinas y cinasas dependientes de ciclinas (Platet, Cathiard et al., 2004).

De los tumores de mama diagnosticados en mujeres, del 50% al 80% son positivos para ER $\alpha$ , y su expresión es esencial para elegir la hormonoterapia como tratamiento; cabe destacar que la presencia del ER $\alpha$  se correlaciona con un pronóstico favorable y se ha observado que en pacientes positivas para ER $\alpha$  hay baja recurrencia de tumores luego del tratamiento demostrando grandes beneficios (Platet, Cathiard et al., 2004).

#### **1.5.4 TERAPIA HORMONAL CON TAMOXIFENO PARA CÁNCER DE MAMA**

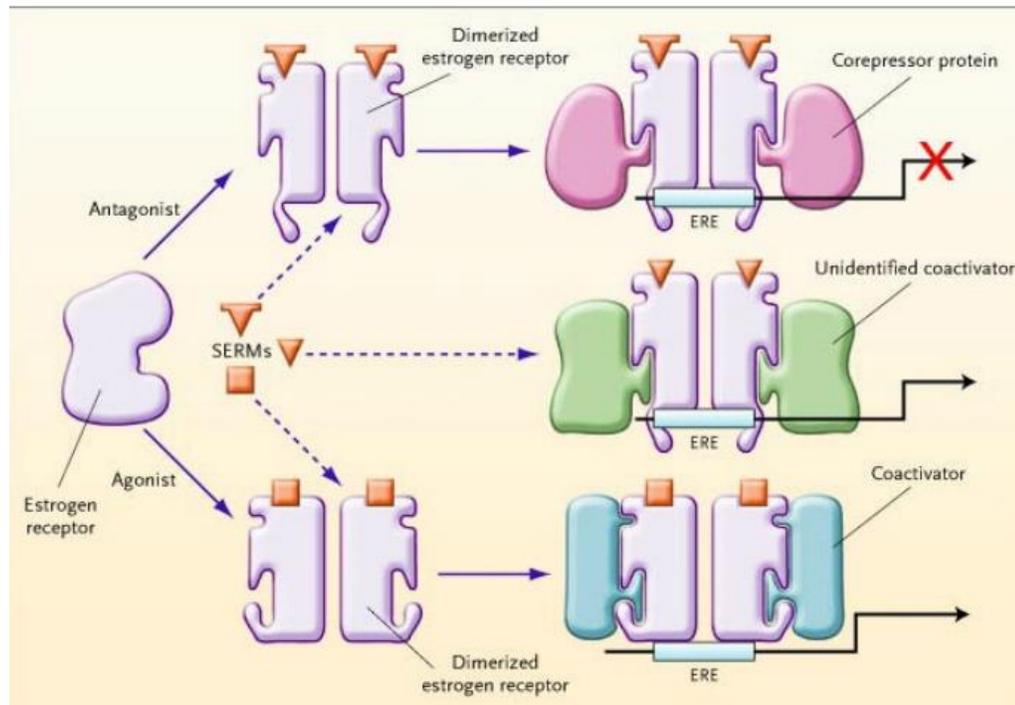
Teniendo en cuenta que muchos tumores son dependientes de estrógenos, existen diferentes estrategias hormonales de tratamiento, dentro de las cuales están los moduladores selectivos a receptores de estrógenos como el tamoxifeno (Osborne 1998).

Los efectos del tamoxifeno en el tratamiento del cáncer de mama están relacionadas con sus propiedades antiestrogénicas, las respuesta de los tejidos sensibles a estrógenos varían dependiendo del tipo de tejido, en la mama actúa como un fármaco anticancerígeno bloqueando los ER y en endometrio actúa como carcinogénico al ser agonista de los ER (Mourits, De Vries et al., 2001). Inicialmente, el tamoxifeno fue usado como tratamiento paliativo del cáncer de mama avanzado, luego como un adyuvante en casos de cirugía de tumores tempranos y recientemente, su actividad en quimio-prevencción del cáncer de mama ha sido demostrada (Fisher, Costantino et al., 1998). Sin embargo, y a pesar de su importante papel en la profilaxis y el tratamiento del cáncer de mama se ha observado que en las pacientes que están expuestas a largo periodos de tratamiento con este fármaco, existe un aumento en el riesgo relativo de cáncer de endometrio (Senkus-Konefka, Konefka et al., 2004).

##### **1.5.4.1 MECANISMO DE ACCIÓN DEL TAMOXIFENO**

El tamoxifeno forma parte de los fármacos denominados Moduladores De los Receptores de Estrógenos (SERMS), y actúa como agonista o antagonista de los receptores dependiendo del tejido donde actúe. Las propiedades agonistas o antagonistas, dependen de los cambios conformacionales que genera en los receptores, y su interacción con proteínas correpresoras o coactivadoras expresadas en cada tejido, generando cambios subsecuentes en la transcripción génica (Pickar, MacNeil et al. 2010) (figura 5); en mama

actúa como antagonista de los ER, lo que lo hace eficiente en el tratamiento de cáncer de mama (Pickar, MacNeil et al. 2010), y en útero presenta una amplia actividad agonista sobre los ER en el epitelio vaginal, el miometrio y el endometrio, donde genera aumento en el peso uterino, engrosamiento del endometrio y condensación del estroma periglandular (Cano and Hermenegildo 2000).



**Figura 5. Mecanismo de acción de los SERMs.** Después que los SERMs se unen a los ER el complejo SERM-ER sufre cambios conformacionales dependiendo del tejido donde actúe, que va a llevar a que se unan proteínas coactivadoras que promueven la transcripción o proteínas corepresoras que detienen la transcripción y determinan la expresión de genes blanco. Tomada de <http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJM200303203481230>.

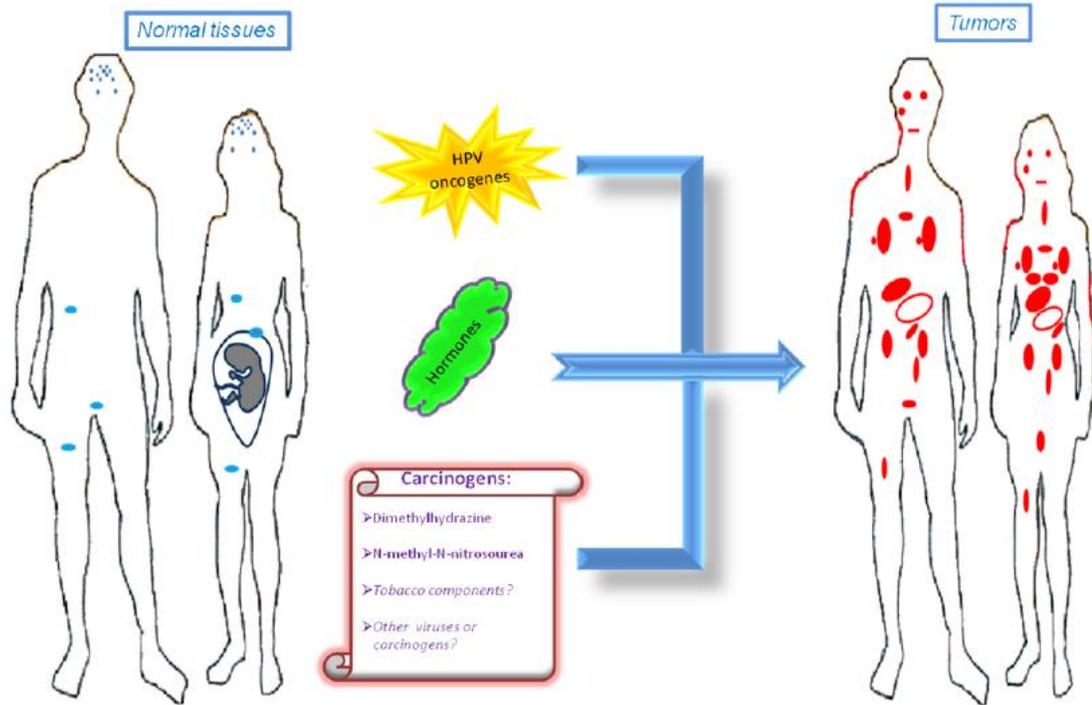
#### 1.5.4.2 EFECTOS SECUNDARIOS DEL TAMOXIFENO

La actividad agonista/ antagonista del tamoxifeno lo lleva a presentar diferentes efectos secundarios. En hueso actúa como agonista de los receptores de estrógenos, aumentando el recambio óseo (Kangas 1992); en hipotálamo actúa como antagonista de los ER $\alpha$  en mujeres

premenopáusicas, generando aumento en la liberación de la hormona foliculoestimulante (FSH) y hormona luteinizante (LH), induciendo la ovulación; pero en mujeres post-menopáusicas actúa como agonista de los ER $\alpha$  disminuyendo la FSH y la LH disminuyendo los síntomas de la menopausia; en hígado es agonista de los ER $\alpha$ , aumentando la síntesis de factores de coagulación y riesgo de trombofilia, y en útero actúa como agonista de los ER $\alpha$  aumentando el riesgo de desarrollo de cáncer de endometrio y Tumor mixto mulleriano (Singh, Stringfellow et al., 2007). A pesar de esto, no todas las pacientes que son tratadas con tamoxifeno presentan cambios consistentes con el efecto agonista en los ER. En mujeres premenopáusicas, el efecto del tamoxifeno es antiestrogénico en tejido uterino y vaginal y es estrogénico en los mismos tejidos de mujeres postmenopáusicas (Yang, Trapkin et al., 2001). Este efecto tiene que ver con el nivel endógeno de estrógenos, ya que en un ambiente rico en estrógenos su efecto es antagonista, mientras que en un ambiente bajo en estrógenos, el efecto es principalmente agonista (Mourits, De Vries et al., 2001),(Yang, Trapkin et al., 2001)

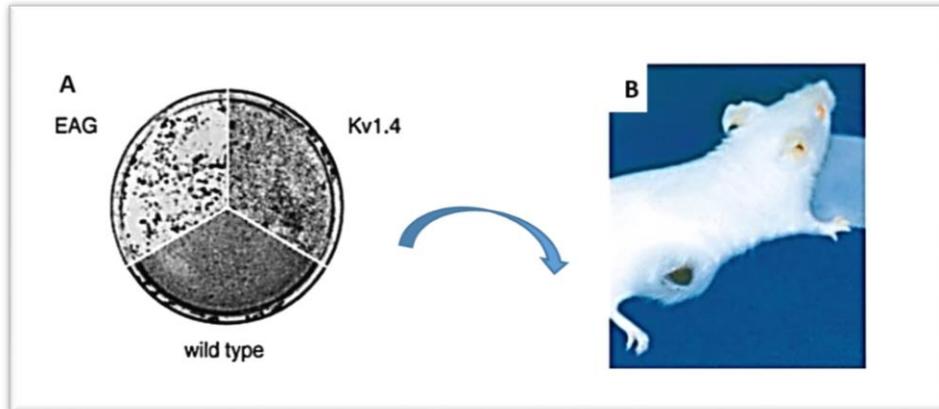
## **1.6 PAPEL DE LOS CANALES DE POTASIO EN LA PROLIFERACIÓN CELULAR**

El canal de potasio EAG1 o *éter à-go-gó* (Kv10.1) forma parte de una familia de canales conformados por tetrámeros (cuatro subunidades) que a su vez están compuestas por seis segmentos transmembranales, cuentan con un dominio S4 que actúa como sensor de voltaje, un dominio PAS que actúa como sensor de oxígeno y un dominio de unión a nucleótidos (cNBD) en el Carboxilo terminal (Bauer and Schwarz 2001). La expresión del canal de potasio EAG1 está limitada a cerebro, placenta, glándula adrenal y transitoriamente en mioblastos (Ortiz, Montante-Montes et al., 2011), y ha sido ampliamente estudiado por su participación en el desarrollo de cáncer, debido a que se expresa anormalmente en tejidos tumorales (Rodríguez-Rasgado et al., 2012) (Figura 6).



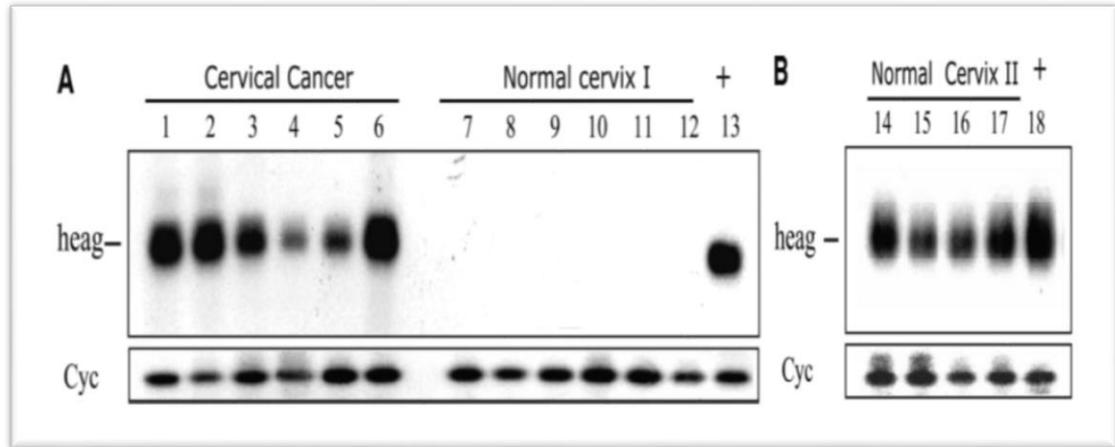
**Figura 6. Distribución del canal de potasio EAG1, en tejido normal y tumoral:** La distribución del canal está restringida a algunos órganos que se simbolizan de color azul. Cuando hay exposición a algunos agentes carcinógenos como VPH, hormonas o agentes externos ambientales, la expresión del canal aumenta en diferentes órganos y se simboliza de color rojo, la detección de canal en lesiones premalignas podría indicar a este canal como un potencial marcador temprano de tumores. Tomado de Rodríguez-Rasgado, et al., 2012.

La relación del canal EAG1 con la oncogénesis y la progresión tumoral se ha estudiado transfectando el canal EAG1 en células de mamíferos y éstas adquirieron un fenotipo transformado, mostrando crecimiento en ausencia de suero, pérdida de la inhibición por contacto e inducción de la formación de tumores cuando son implantadas en ratones inmunosuprimidos (figura 7). Además, al inhibir la expresión de EAG1 con oligonucleótidos antisentido se redujo la proliferación celular (Pardo, et al., 1999); este hecho muestra que el canal EAG1 está implicado en la oncogénesis y la progresión tumoral.



**Figura 7. Papel del canal EAG1 en el crecimiento celular y la progresión tumoral.** **A.** Células transfectadas con EAG1 pueden crecer en ausencia de suero y tienen pérdida de la inhibición de contacto, mientras que aquellas células transfectadas con otro canal de potasio y wild type no crecen en ausencia de suero. **B.** cuando las células se implantan en ratones inmunosuprimidos producen tumores agresivos. Tomado y modificado de Pardo, et al., 1999.

En la última década se han realizado estudios que muestran la expresión de EAG1 en cervix (Farías, Ocana et al., 2004) (Díaz, Ceja-Ochoa et al., 2009). En estos trabajos se estudiaron cultivos primarios de cáncer de cervix, tejido de cáncer cervical y biopsias de cervix normal; encontraron que en todos los cultivos de líneas celulares de cáncer y en el tejido de cáncer cervical, se expresó el canal EAG1, mientras que en las biopsias sanas no había expresión del canal. Interesantemente, en biopsias de tejido cervical aparentemente sano que presentaron infección del virus de papiloma humano, hiperplasia adenomatosa de endometrio o cistoadenoma seroso paratubarico sin células atípicas se expresó el canal EAG1 (figura 8). Por otra parte, en estudios de cáncer mamario, se detectó el mRNA de EAG1 en el tejido de la glándula mamaria “libre de tumor” que circunda a un carcinoma mamario (Hemmerlein, Weseloh et al., 2006) y de tal forma se puede proponer que EAG1 puede ser considerado como un marcador temprano de desarrollo de tumores siendo además, un posible blanco terapéutico.



**Figura 8. Southern Blot de EAG1 en muestras cervicales.** A. muestra expresión EAG1 de cultivos primarios de biopsias de cáncer cervical (1-5) y adenocarcinoma endocervical (6), los controles sanos no presentaron expresión de EAG1 (7-12). B. Detección de EAG en muestras control con VPH (14), hiperplasia de endometrio (15), cistoadenoma sin células atípicas (16) y diagnóstico no establecido (17), los controles positivos fueron células CHO transfectadas con EAG1 (13 y 18). Tomado de Farías, et al., 2004.

Sumado a los anteriores antecedentes, en reportes recientes se ha observado que el canal EAG1 en células cancerosas es regulado por estrógenos, tal como lo demuestran Díaz et al., 2009, quienes evaluaron la expresión del canal EAG1 en células HeLa que expresaron el ER $\alpha$  y encontraron que los estrógenos regulan a la alta la expresión del canal EAG1 resaltando que para esto es necesaria la presencia del ER $\alpha$ . Sumado a esto, la administración de tamoxifeno sin la influencia de estrógenos aumenta la expresión del canal EAG1. Por otro lado y como antecedentes directos, experimentos realizados por Zamora 2013 en los cuales se administró tamoxifeno a ratones en edad fértil por tres meses no se evidenciaron cambios en la expresión del canal de potasio EAG1 entre el grupo control y tratado en el cérvix y el útero. En el presente proyecto se buscó disminuir la concentración endógena de estrógenos para evaluar el efecto agonista del tamoxifeno en las condiciones que se asimilan a las de la menopausia y su influencia sobre la expresión del canal EAG1.

## **2. JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS**

### **2.1 JUSTIFICACIÓN**

El tamoxifeno es uno de los principales fármacos de elección en casos de cáncer de mama positivos a receptores de estrógenos, sin embargo, a pesar de su efecto benéfico en mama, tiene efectos secundarios en diferentes órganos siendo su principal efecto la proliferación en el endometrio, llevándolo a ser un factor de riesgo para el desarrollo del cáncer de endometrio en mujeres menopáusicas tratadas con tamoxifeno. Este tipo de cáncer es de difícil detección y lleva a alteraciones en la calidad de vida de las mujeres que son afectadas por este padecimiento; por tal motivo es de gran importancia estudiar marcadores tempranos de alteraciones tumorales como lo es el canal de potasio EAG1 ya que se ha observado su alta expresión en lesiones tempranas neoplásicas. El estudio de este canal fortalecería su potencial papel como marcador temprano de tumores endometriales y posibles alteraciones en tejido cervical cuando hay exposición a tamoxifeno.

### **2.2 HIPÓTESIS**

El canal EAG1 se expresa en un mayor porcentaje en el útero y el cérvix en ratones hembra ovariectomizadas expuestas a tamoxifeno en comparación con quienes no lo están.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GENERAL**

- Determinar la expresión del canal EAG1 en muestras de cérvix y útero de ratones hembra ovariectomizadas que reciben tamoxifeno por 3 meses.

#### **3.2 OBJETIVOS PARTICULARES**

- Ovariectomizar a ratones hembra y posteriormente tratarlas con comprimidos de tamoxifeno por tres meses.
- Realizar inmunohistoquímica del canal EAG1 a los tejidos de cérvix y útero de ratones hembra ovariectomizadas tratadas con tamoxifeno.
- Estudiar la expresión de EAG1 por PCR tiempo real en los tejidos de cérvix y útero de ratones hembra ovariectomizadas tratadas con tamoxifeno.
- Estudiar la expresión de los receptores de estrógenos alfa y beta por PCR tiempo real e inmunohistoquímica en tejidos de cérvix y útero de ratones hembra ovariectomizadas tratadas con tamoxifeno.

## 4. METODOLOGÍA

### 4.1 MODELO ANIMAL

Para el estudio se emplearon ratones hembra de la cepa Balb-c, de un peso de 19 gramos y se dividieron en tres grupos que se muestran en el siguiente cuadro:

GRUPO CONTROL SIN OVARECTOMÍA	GRUPO CON OVARECTOMÍA (OVX)	GRUPO CON OVARECTOMÍA Y TRATAMIENTO CON TAMOXIFENO (OVX+TX)
<ul style="list-style-type: none"><li>• PERIODO: <b>4 MESES</b></li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• PERIODO: <b>4 MESES</b></li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• PERIODO DEL PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO Y RECUPERACIÓN: <b>1 MES</b></li></ul>
		<ul style="list-style-type: none"><li>• PERIODO DE LA ADMINISTRACIÓN DE COMPRIMIDO DE TAMOXIFENO 0,05 mg VIA SC: <b>3 MESES</b></li></ul>

Al grupo *control* no se le realizó ningún procedimiento; al segundo grupo (OVX) únicamente se le realizó la ovariectomía bilateral, que es un procedimiento quirúrgico en el cual se remueven irreversiblemente los ovarios del animal, este procedimiento es comúnmente utilizado para generar deficiencia de estrógenos en roedores. (Idris 2012) El tercer grupo (OVX+TX) es el grupo al que se le realizó la ovariectomía y se le administró un comprimido de tamoxifeno vía subcutánea.

#### 4.1.2 OVARECTOMÍA.

Para este procedimiento la combinación anestésica utilizada en los animales fue ketamina (“ANESKET VET” LAB PISA) y xilocina (ROMPUN LAB

BAYER) (85mg/ml ketamina, y 15mg/ml xilocina) y se administró 0.1 ml por vía intramuscular (IM), posteriormente se vigiló el efecto del anestésico que duró entre 15 y 45 min y la respiración del animal; posteriormente se rasuró la región dorsolumbar y se realizaron las incisiones en la región lumbar en ambos costados, se extrajeron los ovarios previa visualización y se ligó alrededor de la porción superior de la trompa uterina con sutura absorbible, luego de la extracción se suturó el peritoneo y la piel de las ratonas y finalmente se administró el antibiótico (Baytril 5% LAB. BAYER) por vía subcutánea.

Los animales despertaron una hora después de iniciada la anestesia y se vigiló el estado de la herida.

Luego de este procedimiento se mantuvo el antibiótico por vía oral por 5 días y se continuó observando el estado general de los animales.

#### **4.1.3 DETERMINACIÓN DE LA FASE DEL CICLO ESTRAL.**

El ciclo reproductivo de los ratones hembra es llamado ciclo estral y pasa por cuatro etapas, proestro, estro, metaestro y diestro; cada etapa se relaciona con los diferentes niveles endógenos de estrógenos y progesterona del roedor (Biegel, Cook et al. 1998); para la determinación de la fase del ciclo estral de los roedores se realizó frotis vaginal y posterior observación en el microscopio para determinar la morfología de las células.

Para la toma del frotis vaginal se inmovilizaron los animales de tal forma que quedara expuesto el conducto vaginal, posteriormente con la pipeta limpia y la punta esterilizada, se tomó 10  $\mu$ L de PBS phosphate buffered saline que se introdujo suavemente en la vagina del roedor cuidando no introducir demasiado la punta, se lavó de dos a tres veces con el líquido y se retiró. En este caso el líquido llevaba las células necesarias para determinar la etapa

del ciclo estral. La muestra obtenida se colocó en un portaobjetos y se observó de inmediato en el microscopio.

Este procedimiento se realizó cada mañana por cuatro días seguidos en todas las hembras con el fin de vigilar la etapa del ciclo estral. (Ng, Yong et al., 2010)

#### **4.1.4 CONTROL DE PESO**

La medición del peso de las ratonas se realizó al inicio y al finalizar el tratamiento justo antes de los sacrificios, de tal forma que se obtuvieron 4 mediciones durante el desarrollo del modelo.

Para la medición del peso se utilizó una balanza debidamente calibrada y se pesaron los animales siempre a la misma hora de la mañana.

#### **4.1.5 TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO.**

Luego de la ovariectomía y la eliminación renal del antibiótico, al grupo OVX+TX se le administró 0,05 mg de tamoxifeno vía subcutánea (s.c) que tiene una liberación de 90 días, al finalizar el tiempo de tratamiento se sacrificaron los animales y se realizó la extracción del útero y cérvix para realizar inmunohistoquímica y PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) en tiempo real para analizar la expresión de EAG1, ER $\alpha$  y ER $\beta$ .

#### **4.2 ANÁLISIS DE ÓRGANOS.**

Luego de extraer el útero y el cérvix, se sumergieron en un vial conteniendo formol al 10% en PBS, posteriormente, los cortes se deshidrataron en alcoholes y embebieron en parafina. Se hicieron cortes de 3 micrómetros de grosor que se ubicaron en laminillas precargadas y se finalizó la fijación con calor (T°: 60°C). Las laminillas se emplearon para la tinción de Hematoxilina/Eosina (HE) y para la Inmunohistoquímica (IHQ).

#### **4.2.1 TINCIÓN DE HEMATOXILINA EOSINA**

Esta técnica permite el análisis histopatológico, ya que permite evidenciar el núcleo en color azul y el citoplasma de las células del endometrio y el cérvix de color rosa (Fischer, Jacobson et al., 2008)

Para realizar la tinción las rebanadas se desparafinaron y rehidrataron con xileno, y un tren de alcoholes desde alcohol absoluto hasta alcohol al 70%. Posteriormente, se aplicó la hematoxilina de Harris durante 15 min, se diferenció en alcohol ácido, se viró a color azul en agua amoniacal y se lavaron, en este paso los núcleos se deben ver de color azul y el citoplasma tenue. En seguida se realizó la tinción con eosina que le da color rosa al citoplasma y se pasaron las laminillas por el tren de alcoholes desde alcohol al 70% hasta alcohol absoluto y xileno, finalmente se cubrieron con resina y cubreobjetos.

#### **4.2.2. INMUNOHISTOQUÍMICA.**

Esta técnica permite buscar antígenos específicos en células o tejidos, con el empleo de anticuerpos que pueden ser visualizados a través de la tinción, por ejemplo, el color azul indica que no hay unión del antígeno al anticuerpo y cuando hay interacción entre el antígeno y el anticuerpo se observa color café (Matos, Trufelli et al., 2010).

En esta tinción, las rebanadas se desparafinaron y rehidrataron con xileno, y un tren de alcoholes desde alcohol absoluto hasta alcohol al 70%, en seguida se realizó la recuperación antigénica inducida por calor, colocando las laminillas en el buffer de citratos pH 6 y se colocaron en la olla de presión a máxima presión y máxima temperatura por 15 minutos, posteriormente se utilizó el Kit Rabbit Polidetector HRP/DAB ref BSB 022, iniciando con el bloqueo de la actividad endógena de la peroxidasa con 100 µl de bloqueador durante 10 minutos. En seguida se agregaron 100 µl de inmunodetector

protein Blocker/Antibody diluent Ref. BSB 0113 por 10 minutos para bloquear proteínas inespecíficas que generan fondo, en seguida se agregaron el anticuerpo problema, diluido en el anterior reactivo, y se incubó por una hora. Los anticuerpos primarios usados fueron:

- Para EAG1: KCNH1 Antibody Ref. NBP1-42816 Novus, dilución 1 $\mu$ L:500 $\mu$ L.
- Para ER $\alpha$ : Anti- estrogen receptor alpha antibody–chip grade Ref.ab 32063 Abcam, dilución 1 $\mu$ L:200  $\mu$ L.
- Para ER $\beta$ : Estrogen receptor Beta antibody Ref. NB-120-3577 Novus, dilución 1 $\mu$ L:300  $\mu$ L.

Luego de la incubación del anticuerpo se lavaron las laminillas y se agregaron 100  $\mu$ l de la enzima HRP (horseradish peroxidase) por 45 minutos, esta enzima cataliza la conversión de substratos cromogénicos, en este caso el sustrato cromogénico es 3,3'diaminobencidina (DAB); posteriormente se realizó el revelado con DAB (Polydetector DAB Chromogen), y luego de esto se realizó el contraste con hematoxilina; finalmente se pasaron las laminillas por el tren de deshidratación sumergiéndolas de dos a tres veces de forma regresiva a los baños desde el alcohol al 70% hasta el alcohol absoluto y el xileno para ser cubiertas luego con resina y cubreobjeto.

La prueba se considera positiva para EAG1 cuando se presenta una coloración café en el núcleo, citoplasma y/o membrana celular. Para los receptores a estrógenos se considera positivo cuando se presenta una coloración café en el núcleo.

### **4.3. DETERMINACIONES DE BIOLOGÍA MOLECULAR**

Para el análisis por biología molecular, posterior al sacrificio de los ratones hembra se extrajo el útero y el cérvix de todos los animales y se guardaron en tubos eppendorf con 1 ml de trizol (TRIZOL Reagent Cat No 15596-026) y posteriormente se ubicaron en el ultracongelador a -70°C hasta el momento de su uso.

#### **4.3.1. EXTRACCIÓN DE RNA Y SÍNTESIS DE cDNA.**

Luego de conservar los órganos se realizó la extracción del ARN que se basó en el método del trizol. Posteriormente, se cuantificó el RNA en un Nanodrop Lite que es un espectrofotómetro que permite medir microvolúmenes de ácidos nucleicos y proteínas purificadas. En seguida, se realizó el tratamiento con DNAsas con el fin de obtener un cDNA sin contaminación genómica, tomando 2 µg de ARN y 1 µL de DNAasa (1U/1µL) diluida (1:5) que se llevó a un volumen de 8.5 µL con H<sub>2</sub>O usada para resuspender, posteriormente se realizó la transcripción reversa que es una reacción catalizada con una enzima transcriptasa reversa **M-MuLV** (*Moloney Murine Leukemia Virus*) **Reverse Transcriptase**, New England Biolabs Cat. M0253S, que va a actuar en sentido contrario a la transcripción y Oligo dt 12-18 pb primer (1 µg/µl) que se une a la cola de poli-A del RNA y permite iniciar la transcripción.

#### **4.3.2. PCR EN TIEMPO REAL**

Para evaluar la expresión de EAG1, ERα y ERβ, se llevó a cabo la PCR en tiempo real, método que permite obtener un gran número de copias a partir de un fragmento de cDNA o RNA. Éste es un método confiable, sensible y específico para la cuantificación la concentración inicial de RNA y se denomina PCR en tiempo real debido a que se puede observar la amplificación del amplicón en el mismo momento en que se genera (Wong and Medrano 2005).

El equipo utilizado en la PCR fue un StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems y en el sistema de detección se utilizaron sondas TaqMan que son oligonucleótidos cuya secuencia es complementaria a la región central del DNA que se quiere amplificar. En su extremo 5', la sonda tiene un marcador fluorescente (reportero) y en el extremo 3' un quencher o apagador; cuando estas dos moléculas se unen, la fluorescencia del reportero es absorbida por el apagador (fenómeno FRET). Durante la etapa del alineamiento, la Taq polimerasa se une al extremo 3' del primer e inicia la elongación, y cuando se encuentra con la sonda, la degrada por su actividad de exonucleasa 5'-3'. Al ser degradada, libera al reportero del apagador, lo que suprime el fenómeno FRET y la fluorescencia emitida por el reportero puede ser determinada por el sistema (Frahm and Obst 2003). La fluorescencia emitida es directamente proporcional al número de copias obtenidas en cada ciclo de PCR. Para la medición de la expresión, el gen endógeno que se seleccionó fue GUS-B (**Beta-glucuronidase**) (TaqMan® Gene Expression Assays Ref Mm01197698\_m1 applied biosystems) ya que es el más estable de los genes probados, y los genes problema fueron KCNH1 (TaqMan® Gene Expression Assays Ref Mm01316769\_m1 applied biosystems) para EAG1, ER1 (TaqMan® Gene Expression Assays Ref Mm00433149\_m1 applied biosystems) para el ER $\alpha$ , y ER2 (TaqMan® Gene Expression Assays Ref Mm00599821\_m1 applied biosystems) para ER $\beta$ .

El protocolo de temperaturas que se siguió en la PCR fue 95°C por 10 minutos para la activación de la Taq polimerasa y desnaturalización del DNA seguidos de 40 ciclos de amplificación a 95°C por 15 seg y 60°C por un minuto.

### 4.3.3 DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES PROBLEMA

El estudio de la expresión del mRNA se realizó por cuantificación relativa, en este tipo de cuantificación se hace una comparación cuantitativa del Ct (número de ciclos de la PCR en el cual cada muestra consigue llegar al umbral de detección) blanco, normalizada con una referencia interna y comparada contra un control que en este caso fue GUS-B ya que es un gen que se expresa constitutivamente en todos los tipos de tejido.

El análisis se realizó por medio del método de  $\Delta\Delta C_T$  (Doble delta del threshold cycle o ciclo de umbral de detección), en este método comparativo se realiza una primera  $\Delta C_T$  que se calcula de la siguiente manera

$$\Delta C_T = C_T \text{ gen de interés} - C_T \text{ gen endógeno}$$

$C_T$  gen de interés =  $C_T$  de gen de interés (EAG1, ER1 o ER2) de las muestras control.

$C_T$  gen endógeno =  $C_T$  gen de expresión constitutiva (GUS-B), de las muestras control.

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T \text{ del tratamiento} - \Delta C_T \text{ calibrador}$$

$\Delta C_T$  del tratamiento =  $C_T$  del gen de interés –  $C_T$  gen endógeno de cada una de las dos condiciones experimentales (OVX y OVX+TX)

$\Delta C_T$  del calibrador =  $\Delta C_T$  de las muestras control contra las cuales se desea comparar.

El  $\Delta C_T$  del calibrador se obtiene de restarle su propio valor de Ct y el valor resultante es cero. Debido a que cualquier número elevado a una potencia 0 resulta en 1, el calibrador siempre es 1 y el resto de las muestras se encuentran en función de este.

#### **4.3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO:**

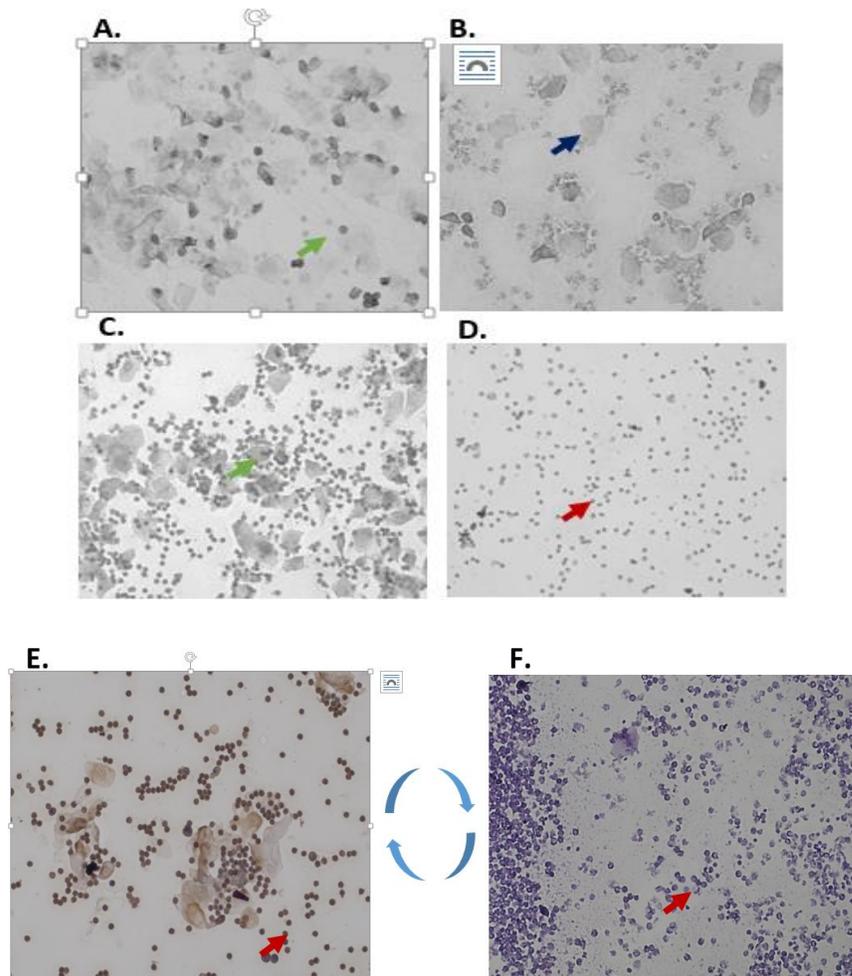
Todos los parámetros fueron analizados con una ANOVA de una vía, usando una prueba de comparación de Tukey; se consideró una diferencia significativa cuando  $p < 0.05$ . La prueba se corrió en el programa estadístico Graphpad Prism pro 5.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 CAMBIOS GENERADOS POR LA OVARIECTOMÍA

#### 5.1.1 FASES DEL CICLO ESTRAL EN RATONAS CONTROL Y CON OVARIECTOMÍA.

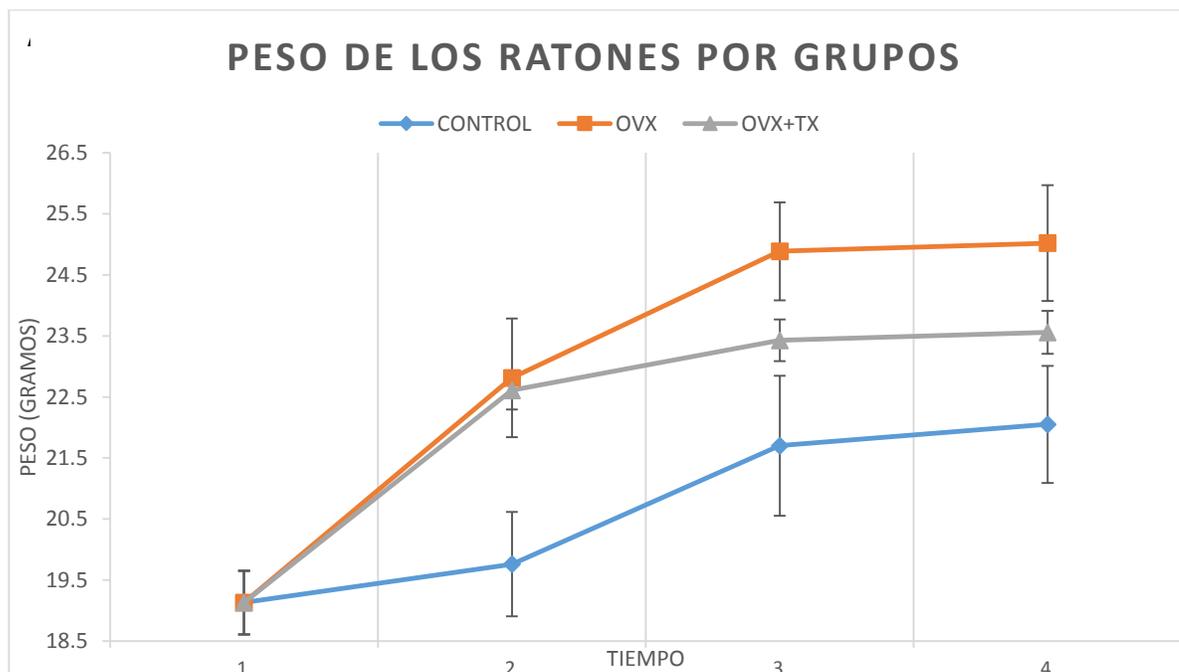
Para confirmar que las ratonas ovariectomizadas estuvieran en unas condiciones similares a las que se presentan en la menopausia; en las muestras de frotis vaginal tomadas de ratonas no tratadas se presentaron las cuatro etapas del ciclo estral como se puede observar en la figura 9; en cambio en las ratonas ovariectomizadas y en las que se les administró tamoxifeno se presentaron únicamente las etapas metaestro y diestro, las cuales se presentan en condiciones de baja concentración de estrógenos.



**Figura 9. Frotis vaginales y representación de las diferentes etapas del ciclo estral: (A-D)** Frotis vaginales obtenidos de las ratonas del grupo control donde se presentaron las 4 etapas del ciclo estral: **A. Proestro**, con alta presencia de células epiteliales nucleadas (flecha verde). **B. Estro**, con alta presencia de células cornificadas (flecha azul). **C. Metaestro**, hay diferentes tipos celulares pero se caracteriza por la presencia de leucocitos (flecha roja), en esta etapa hay descenso de los niveles de estrógenos. **D. Diestro**, con gran cantidad de leucocitos y la presencia de células epiteliales es prácticamente nula. En esta etapa es donde hay menor concentración de estrógenos. **(E-F)** Muestras obtenidas de las ratonas del grupo OVX y OVX+TX, respectivamente, los cuales se encontraron únicamente entre las etapas metaestro **(E)** y diestro **(F)**.

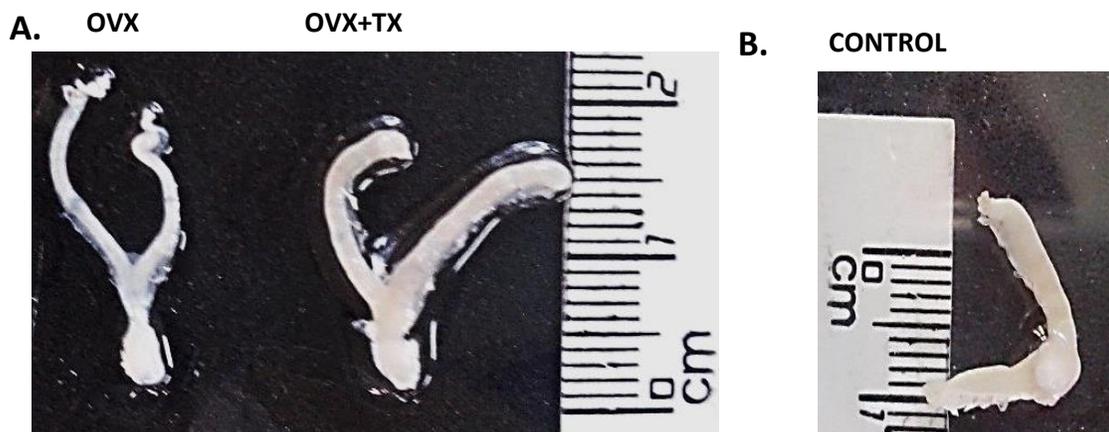
### 5.1.2 PESO Y TAMAÑO DEL ÚTERO EN RATONAS CONTROL Y TRATADAS.

Los tres grupos de ratonas fueron pesados a la misma hora, y al inicio del protocolo experimental, todos los animales presentaron pesos similares. Se observó que el grupo OVX fue el que presentó mayor aumento de peso durante el tiempo de desarrollo del modelo, en seguida el grupo OVX+TX y el grupo control fue el que tuvo menor aumento de peso durante el tiempo de desarrollo del modelo (Figura 10).



**Figura 10. Ganancia de peso en ratones:** El peso promedio inicial de los grupos fue 19,13 gramos, el grupo de ratonas OVX tuvo mayor ganancia de peso durante el desarrollo del modelo llegando a un peso promedio final de 25,01 gr; en el grupo OVX+TX la ganancia de peso fue menor llegando a un peso promedio final de 23,55 gr y la ganancia de peso del grupo control fue la más baja ya que llegaron a pesar el ultimo día, en promedio 22,05 gr.

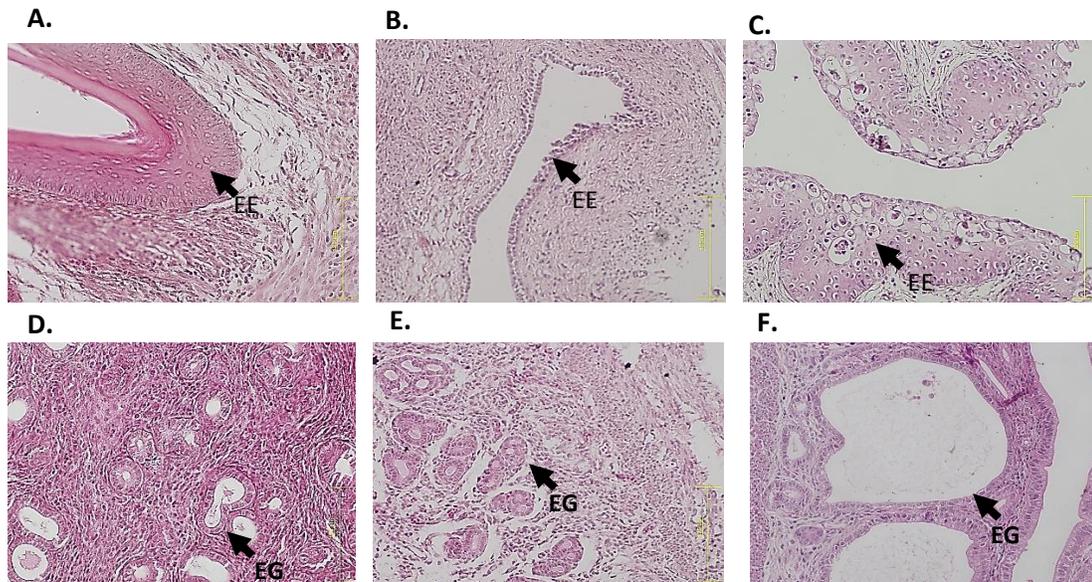
Se sacrificaron los animales y se observó el tamaño de los úteros, en el grupo OVX el útero disminuyó su densidad comparado con el control, presentando 1 mm de diámetro; cuando se administró tamoxifeno la densidad uterina observada fue mayor (2 mm de diámetro, figura 11).



**Figura 11. Tamaño de úteros de ratonas CONTROL, OVX Y OVX + TX.** A. cuando se realiza la ovariectomía, el útero detiene su crecimiento y se retrae, por lo tanto la densidad es menor al control; el diámetro de las trompas uterinas del grupo OVX es de 1 mm y en el grupo OVX+TX es de 2 mm aproximadamente. B. en el grupo control el diámetro de las trompas uterinas es de 2 mm.

### **5.1.3 CAMBIOS HISTOLÓGICOS EN EL ÚTERO Y EL CÉRVIX DE RATONES HEMBRA TRATADAS CON TAMOXIFENO.**

La tinción hematoxilina-eosina permitió identificar las diferentes regiones del cérvix y útero. En el cérvix del grupo OVX el epitelio escamoso estratificado disminuyó y en el grupo OVX+TX este epitelio es similar a los ratones control por presencia de inflamación. En el útero, el epitelio glandular del grupo OVX disminuyó de tamaño, mientras que en el grupo OVX+TX se presentó aumento y se identificó hiperplasia simple sin células atípicas (Figura 12).

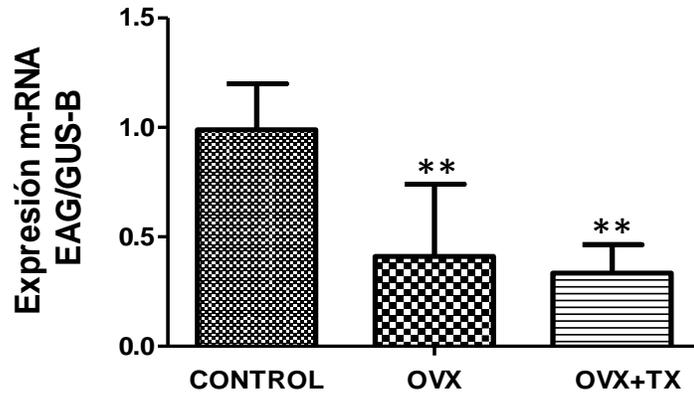


**Figura 12. Tinción de Hematoxilina-Eosina del cérvix y útero.** A-C Cérvix. A. grupo control, B. grupo OVX, C. grupo OVX+TX. D- F Útero. D. Grupo control E. Grupo OVX F. Grupo OVX+TX. EG: Epitelio glandular. EE: Epitelio Escamoso Estratificado.

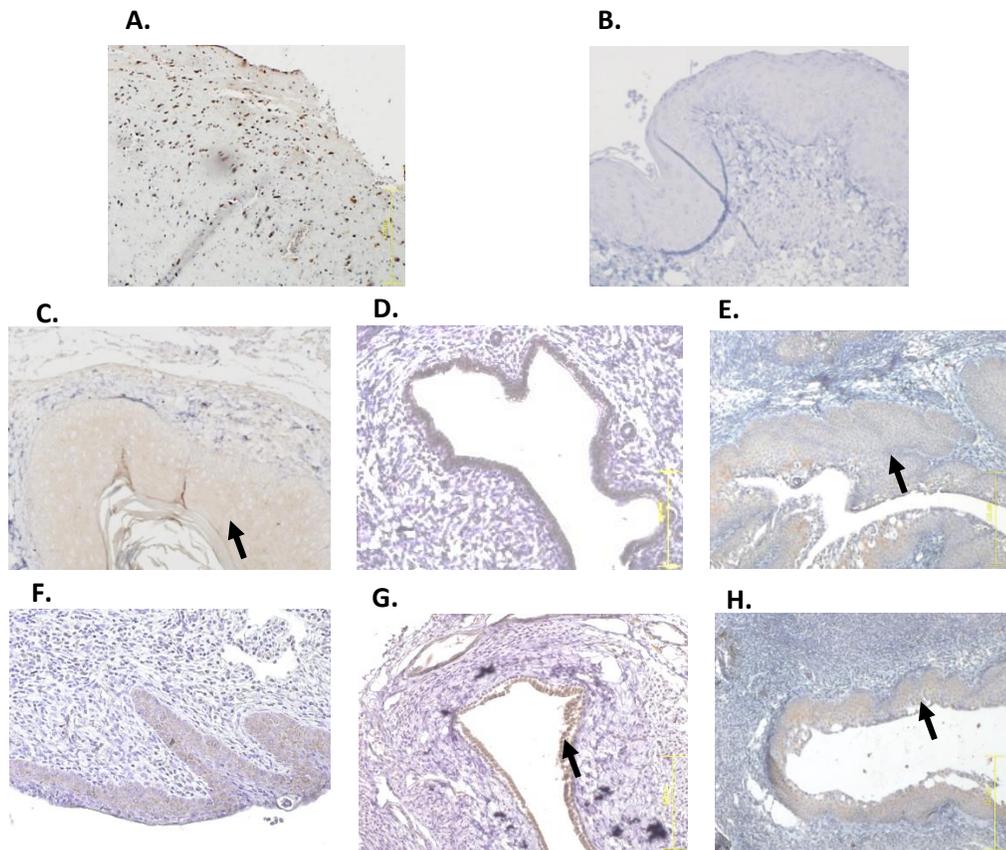
## 5.2 EXPRESIÓN DEL CANAL EAG1 EN CÉRVIX.

### 5.2.1 EXPRESIÓN RELATIVA DE mRNA de EAG1 POR PCR TIEMPO REAL Y DE LA PROTEÍNA POR INMUNOHISTOQUÍMICA EN CÉRVIX.

La expresión del mRNA de EAG1 en el cérvix disminuyó significativamente en el grupo OVX, y en el grupo OVX+TX no se observó cambio con respecto al grupo OVX (Figura 13). En la inmunohistoquímica, en el cérvix del grupo control se observó mínima expresión de EAG1, en el grupo OVX hay disminución del tejido epitelial y la marca del canal EAG1 más baja que la del grupo control y en el grupo OVX+TX hay aumento del tejido epitelial y la expresión de la proteína es similar a los controles. (Figura 14). Cuando la expresión de proteína es positiva se debe observar de color café en el citoplasma o el núcleo.



**Figura 13. Expresión de mRNA de EAG1 en cérvix.** A. se presenta la expresión relativa del mensajero de EAG1 en el cérvix, empleando como gen endógeno GUS-B. , En las barras se muestra promedio  $\pm$  DS, \*\* la prueba de Tukey muestra diferencia significativa con respecto al grupo control. (n=5,  $p < 0.01$ )

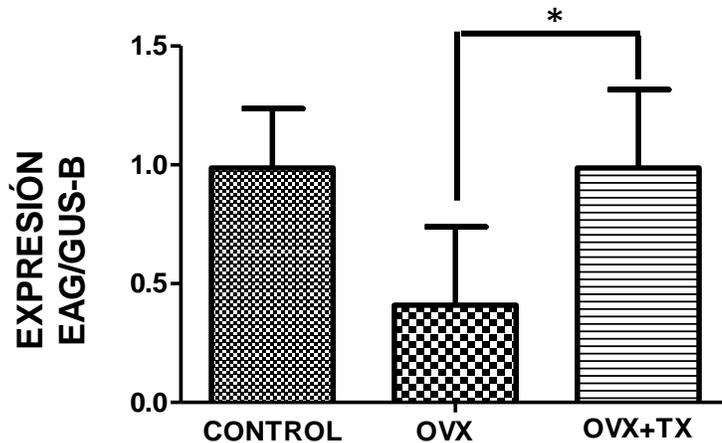


**Figura 14. Expresión de EAG1 en cérvix:** la proteína presenta baja expresión en los tres grupos (tinción café) **A.** control positivo cerebro de ratón. **B.** control negativo, tejido sin anticuerpo primario. **C y F.** Cérvix de grupo control **D y G.** Cérvix del grupo OVX, **E y H.** Cérvix del grupo OVX+TX; Las imágenes se observaron a un aumento 20X.

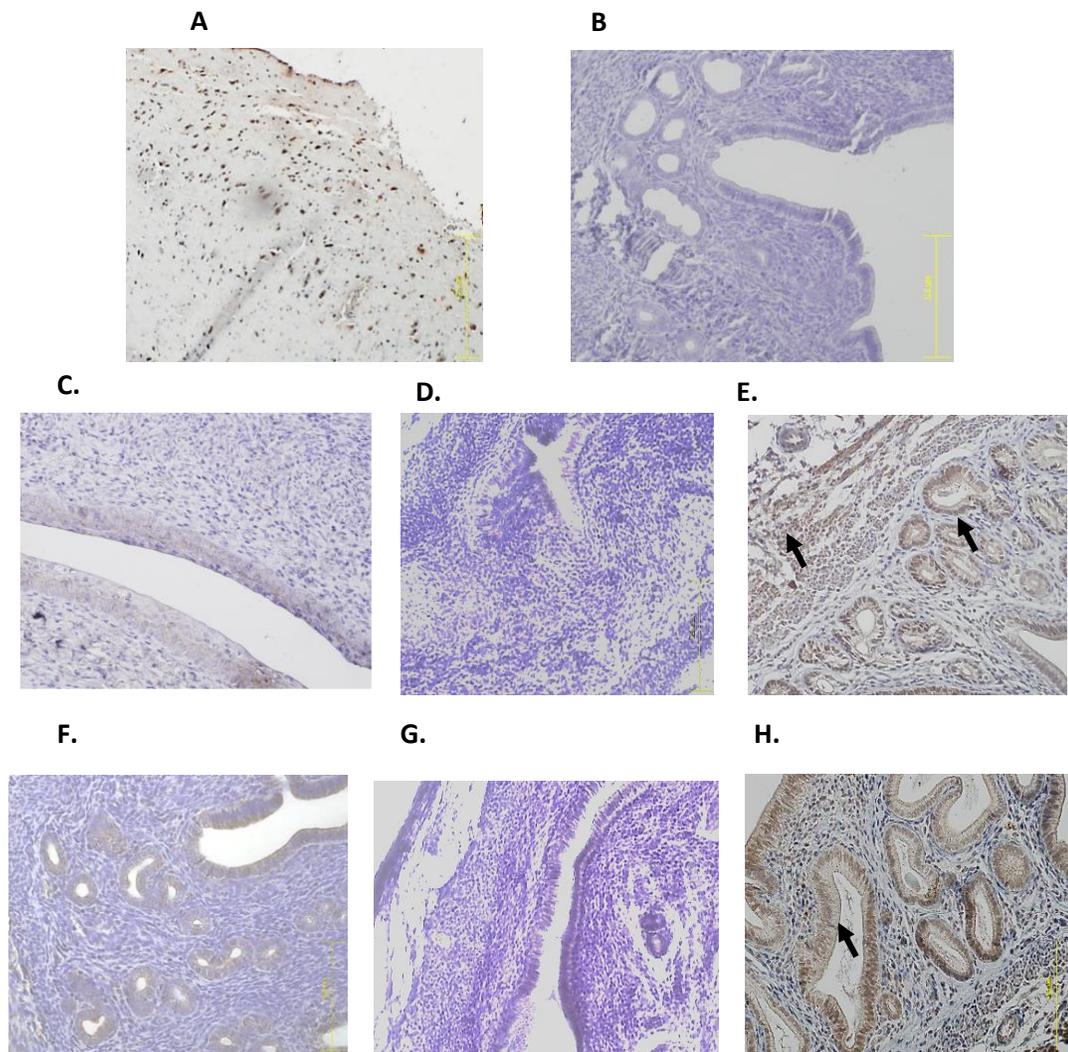
### 5.3 EXPRESIÓN DEL CANAL EAG1 EN EL ÚTERO.

#### 5.3.1 EXPRESIÓN RELATIVA DEL mRNA de EAG1 POR PCR TIEMPO REAL Y DE LA PROTEÍNA POR INMUNOHISTOQUÍMICA EN EL ÚTERO.

La expresión del mRNA de EAG1 es menor en el grupo OVX con respecto al control; en el grupo OVX+TX la expresión es significativamente mayor comparada con el grupo OVX (Figura 15). En cuanto a la expresión de la proteína, en el útero del grupo control se observa mínima expresión de EAG1, en el útero del grupo OVX hay disminución del tejido epitelial y la marca para el canal EAG1 no se puede observar, y en el útero del grupo OVX+TX se observó aumento de la proteína EAG1, con respecto al control y al grupo OVX, principalmente hacia el epitelio glandular y algunas zonas del estroma (Figura 16).



**Figura 15. Expresión de mRNA de EAG1 en el útero.** Se presenta la expresión relativa del mensajero de EAG1 en útero, empleando como gen endógeno GUS-B. En las barras se muestra promedio  $\pm$  SD, \* la prueba de Tukey muestra diferencia significativa entre el grupo OVX y el grupo OVX+TX. (n=5  $p < 0.05$ )

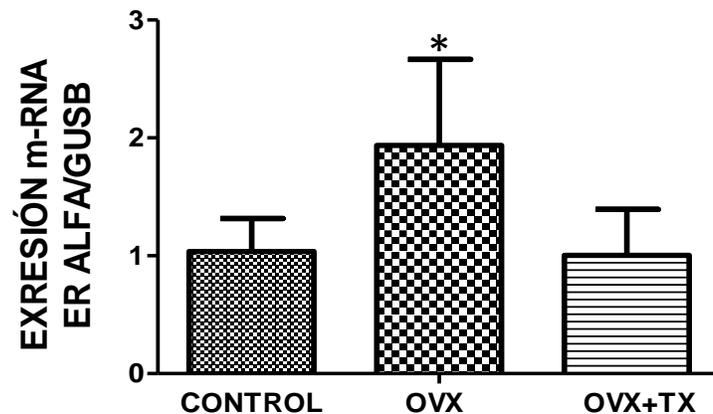


**Figura 16. Expresión de EAG1 en útero:** EAG1 presenta baja expresión en los grupos control y OVX y en el grupo OVX+TX la proteína aumenta (tinción café). **A.** control positivo de EAG1, cerebro de ratón. **B.** control negativo, tejido sin anticuerpo primario. **C y F.** útero de grupo control. **D y G.** útero del grupo OVX. **E y H.** útero del grupo OVX+TX Las imágenes se observaron a 20X.

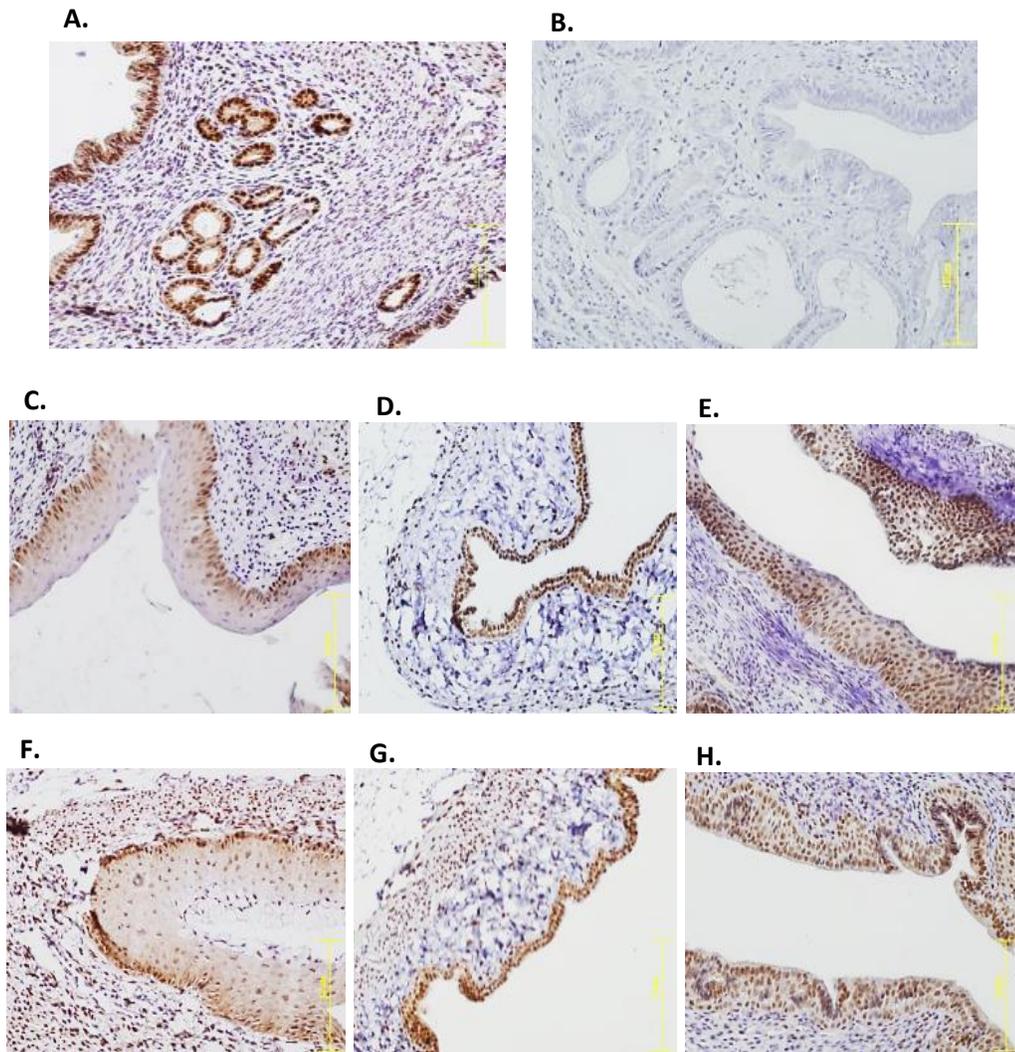
## 5.4 EXPRESIÓN DEL RECEPTOR DE ESTRÓGENOS ALFA EN EL CÉRVIX.

### 5.4.1 EXPRESIÓN RELATIVA DE mRNA DEL RECEPTOR DE ESTRÓGENOS ALFA POR PCR TIEMPO REAL Y DE LA PROTEÍNA POR INMUNOHISTOQUÍMICA EN EL CÉRVIX.

El receptor de estrógenos alfa en el cérvix normalmente presenta expresión alta, sin embargo, en el grupo OVX, el nivel de mRNA aumentó significativamente, el grupo OVX+TX presentó expresión similar a la de los controles (Figura 17). En cuanto a la expresión del receptor en tejido, en el grupo control se observa alta expresión del ER $\alpha$  en el núcleo de las células del tejido epitelial estratificado, en el grupo OVX hay disminución del tejido epitelial y la marca para ER $\alpha$  es fuerte, y en el grupo OVX+TX se observa una expresión similar a la del grupo control (Figura 18).



**Figura 17. Expresión de mRNA de ER $\alpha$  en el cérvix.** Se presenta la expresión relativa del mensajero de ER $\alpha$  en el cérvix empleando como gen endógeno GUS-B. En las barra se muestra promedio  $\pm$  SD, \* la prueba de Tukey muestra diferencia significativa del grupo OVX contra el grupo control. (n=5  $p < 0.05$ )

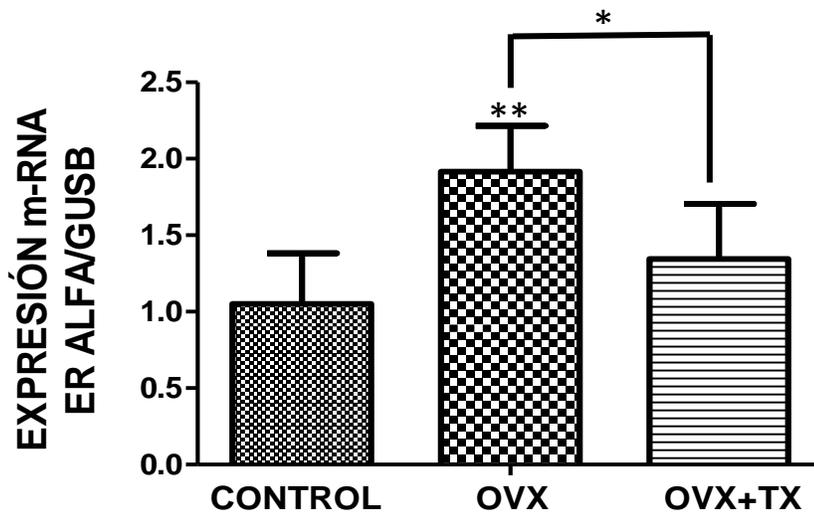


**Figura 18. Expresión de ER $\alpha$  en cérvix.** ER $\alpha$  presenta alta expresión en cérvix de los tres grupos. **A.** Control positivo de ER $\alpha$  útero sano. **B.** control negativo, tejido sin anticuerpo primario. **C y F.** Cérvix de grupo control **D y G.** Cérvix del grupo OVX. **E y H.** Cérvix del grupo OVX+TX. Las imágenes se observaron a 20X.

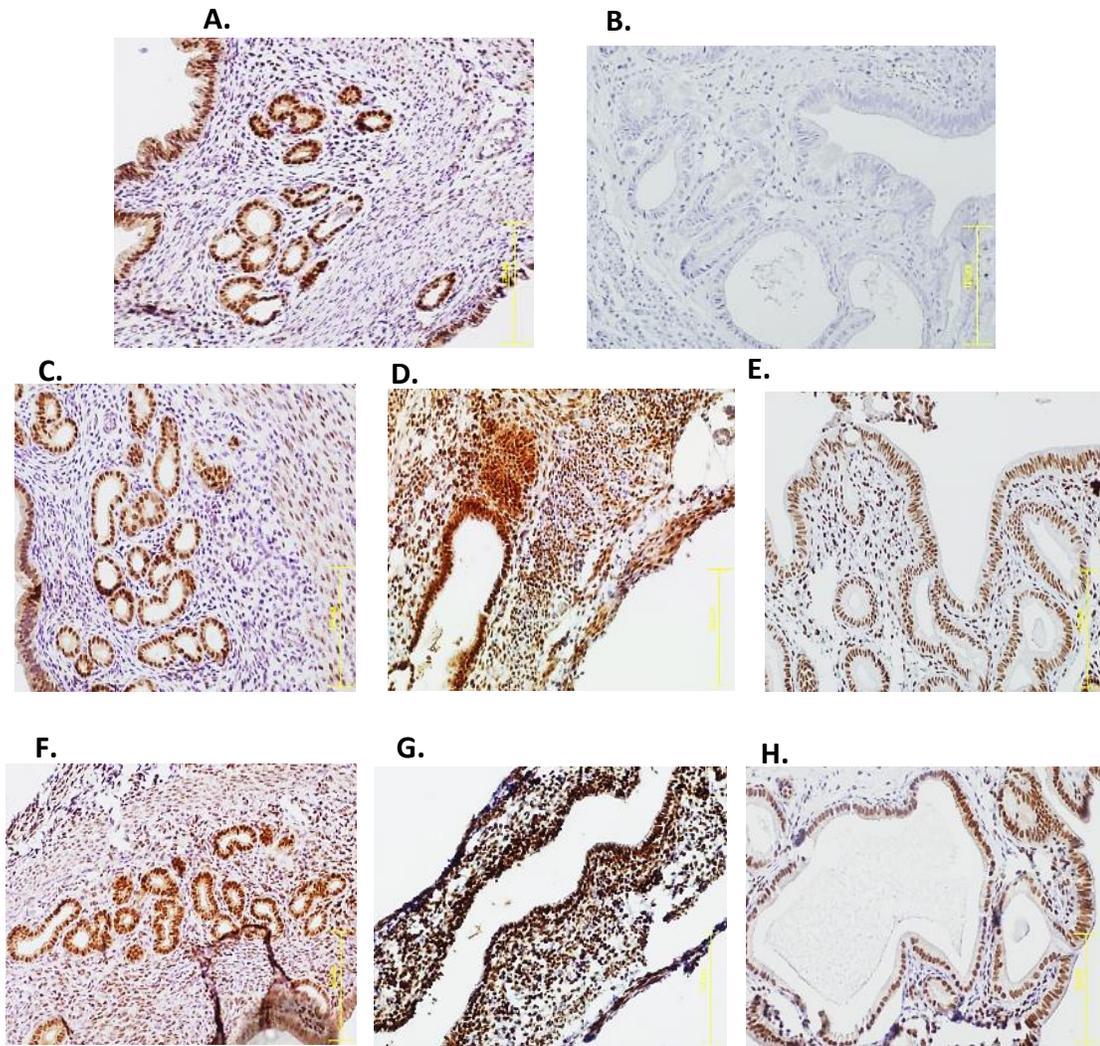
## 5.5 EXPRESIÓN DEL RECEPTOR DE ESTRÓGENOS ALFA EN EL ÚTERO.

### 5.5.1 EXPRESIÓN RELATIVA DE mRNA DEL RECEPTOR DE ESTRÓGENOS ALFA POR PCR TIEMPO REAL Y DE LA PROTEÍNA POR INMUNOHISTOQUÍMICA EN EL ÚTERO.

El receptor de estrógenos alfa en el útero presentó una alta expresión en el grupo control, en el grupo OVX la expresión relativa de mRNA aumentó significativamente y en el grupo OVX+TX, los niveles de mRNA son similares a los del grupo control (Figura 19). En cuanto a la expresión en tejidos, en el útero del grupo control se observó alta expresión del receptor, en el grupo OVX se observó aumento marcado del receptor de estrógenos distribuido por todo el tejido uterino y en el grupo OVX+TX se observó disminución del receptor en distribución y pigmentación y se ubicó principalmente en la región glandular. (Figura 20).



**Figura 19. Expresión de mRNA de ER $\alpha$  en útero.** Se Presenta la expresión relativa del mensajero de ER $\alpha$  en útero, empleando como gen endógeno GUS-B. Las barras muestran promedio  $\pm$  SD, la prueba de Tukey muestra diferencia significativa entre el grupo OVX con respecto al control y con respecto al grupo OVX+TX. (\*\* n=5, p<0.01. \* n=5, p<0,05)

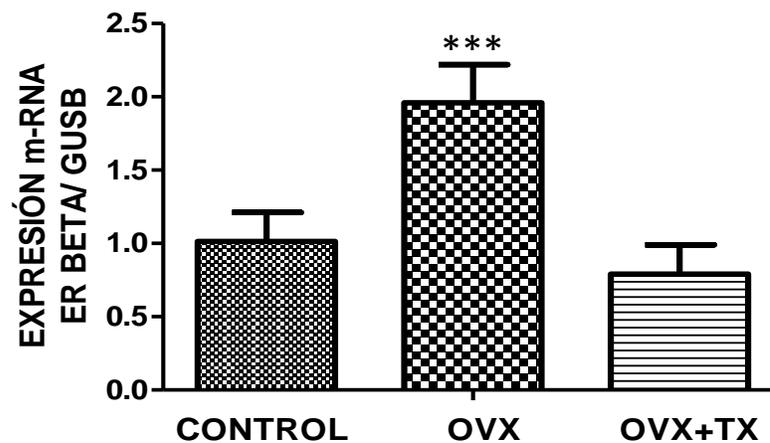


**Figura 20. Expresión de ERα en el útero. A.** control positivo de ERα, útero. **B.** control negativo, tejido sin anticuerpo primario. **C y F.** Útero de grupo control. **D y G.** Útero del grupo OVX. **E y H.** Útero del grupo OVX+TX. Las imágenes se observaron a 20X.

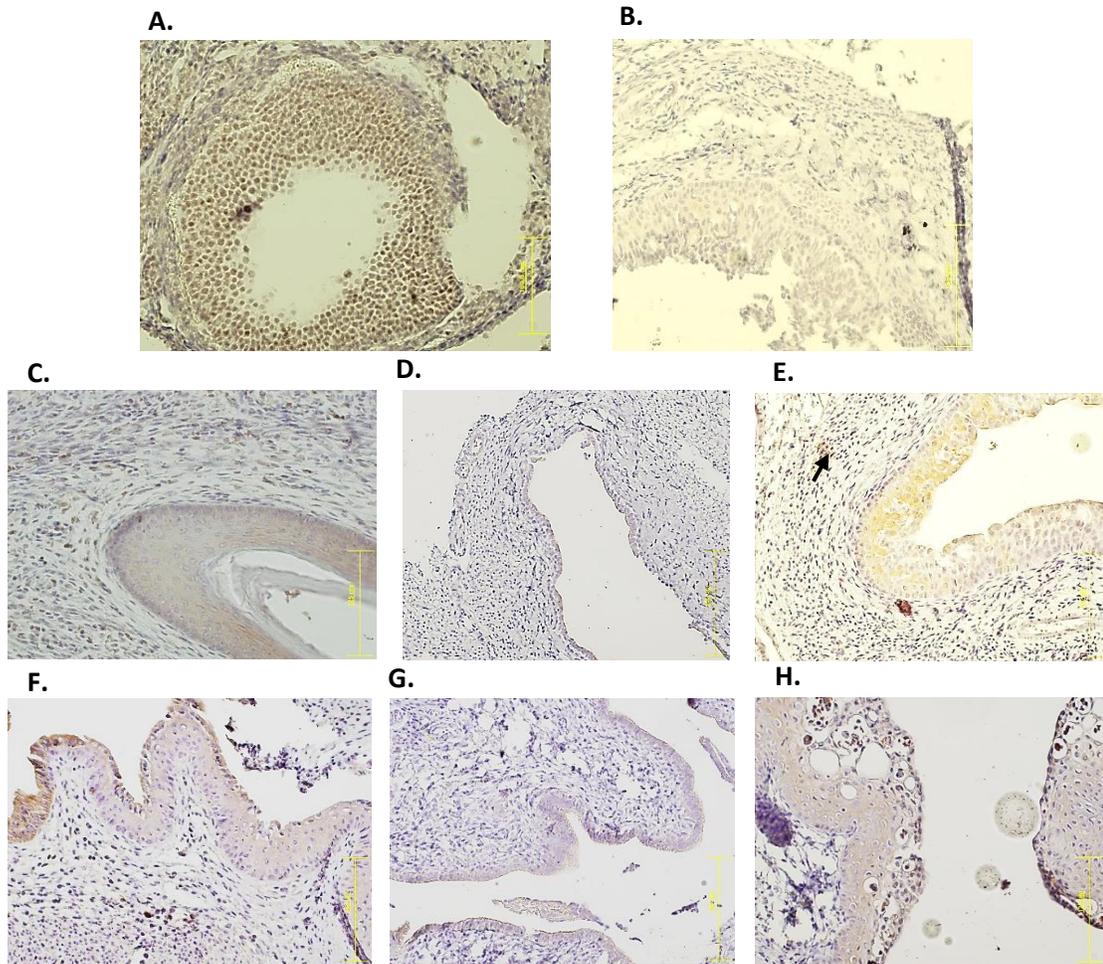
## 5.6 EXPRESIÓN DEL RECEPTOR DE ESTRÓGENOS BETA EN EL CÉRVIX.

### 5.6.1 EXPRESIÓN RELATIVA DE mRNA DEL RECEPTOR DE ESTRÓGENOS BETA POR PCR TIEMPO REAL Y DE LA PROTEÍNA POR INMUNOHISTOQUÍMICA EN EL CÉRVIX.

El receptor de estrógenos beta tiene baja expresión en el útero y el cérvix. En el grupo OVX, el mRNA presentó aumento significativo de la expresión y en el grupo OVX+TX, la expresión disminuyó a niveles similares a los del control (Figura 21). La expresión del receptor en tejido cervical es baja en cérvix de los tres grupos. (Figura 22)



**Figura 21. Expresión de mRNA de ERβ en el cérvix.** Se Presenta la expresión relativa del mensajero de ERβ en el cérvix, empleando como gen endógeno GUS-B. En las barras se muestra promedio ± SD, \*\*\* la prueba de Tukey muestra diferencia significativa entre el grupo OVX con respecto al control y al grupo OVX+TX. (n=5, p< 0,01)

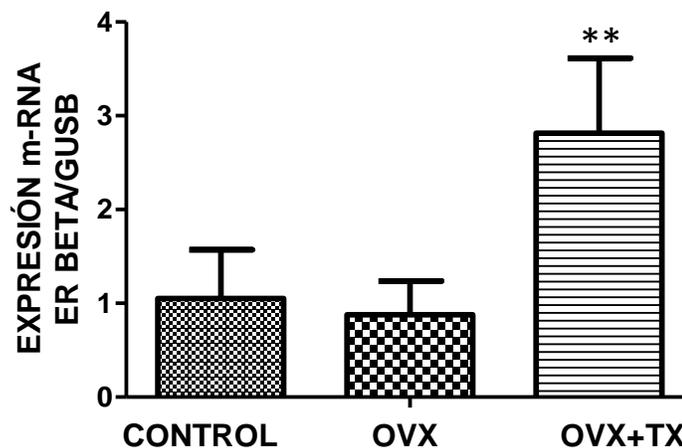


**Figura 22. Expresión de ER $\beta$  en cervix.** ER $\beta$  presenta baja expresión en cervix de los tres grupos. **A.** Control positivo de ER $\beta$  ovario sano. **B.** control negativo, tejido sin anticuerpo primario. **C y F.** Cervix de grupo control **D Y G.** Cervix del grupo OVX **E y H** Cervix del grupo OVX+TX Las imágenes se observaron a 20X.

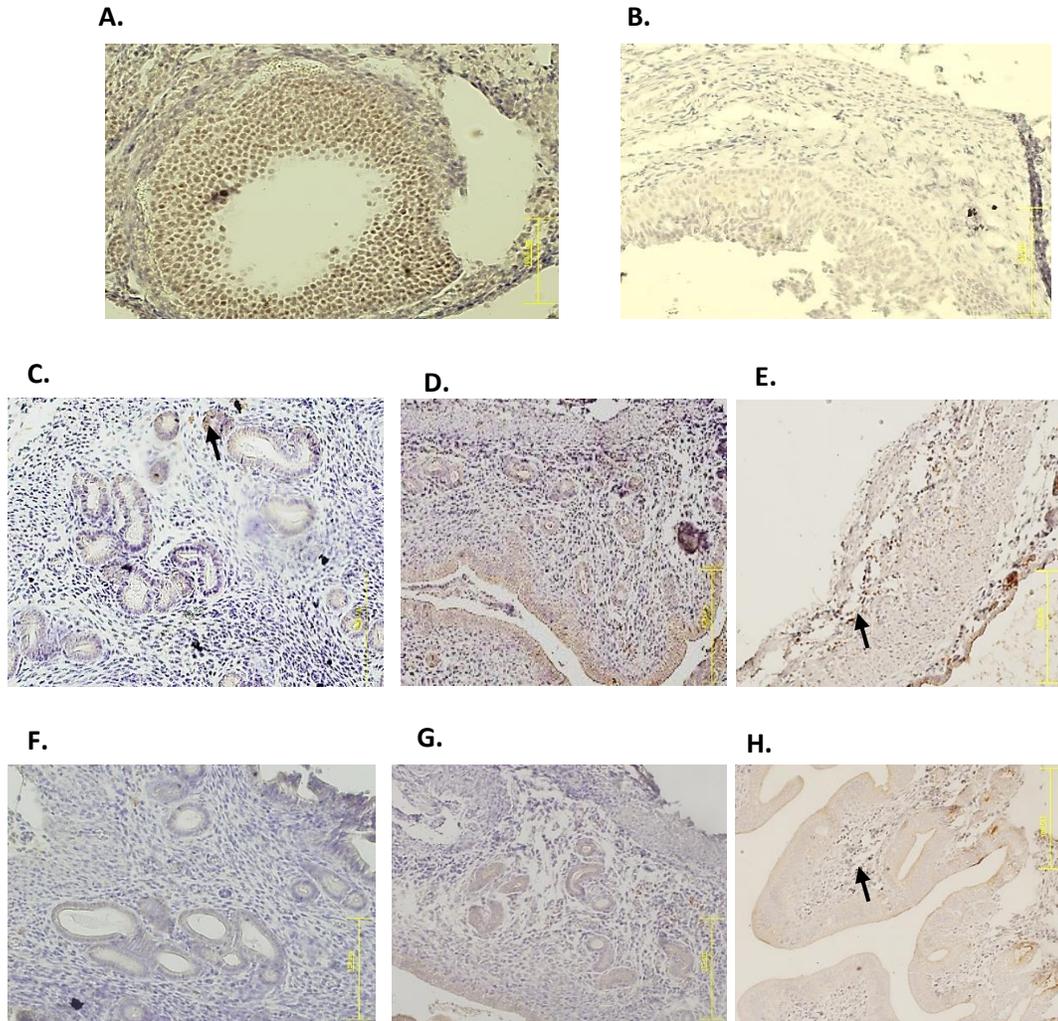
## 5.7 EXPRESIÓN DEL RECEPTOR DE ESTRÓGENOS BETA EN EL ÚTERO.

### 5.7.1 EXPRESIÓN RELATIVA DE mRNA DEL RECEPTOR DE ESTRÓGENOS BETA POR PCR TIEMPO REAL Y DE LA PROTEÍNA POR INMUNOHISTOQUÍMICA EN EL ÚTERO.

El receptor de estrógenos beta tiene baja expresión en el útero y el cérvix. En el grupo OVX, el mRNA no presentó cambios respecto al control y en el grupo OVX+TX la expresión es significativamente mayor con respecto al grupo control y OVX (Figura 23). La expresión del receptor en el cérvix del grupo control es baja, en el grupo OVX hay disminución del tejido glandular y la marca para ER $\beta$  no se observa, en el cérvix del grupo OVX+TX hay baja expresión de ER $\beta$  sin embargo, es mayor que el grupo control y OVX. (Figura 24).



**Figura 23. Expresión de mRNA de ER $\beta$  en el útero.** Se presenta la expresión relativa del mensajero de ER $\beta$  en el útero, empleando como gen endógeno GUS-B, \*\* la prueba de tukey muestra diferencia significativa del grupo OVX+TX con respecto al grupo control. (n=5, p< 0,01)



**Figura 24. Expresión de ER $\beta$  en útero.** ER $\beta$  presenta baja expresión en útero de los tres grupos. **A.** Control positivo de ER $\beta$  ovario sano. **B.** control negativo, tejido sin anticuerpo primario. **C y F.** Útero de grupo control. **D Y G.** Útero del grupo OVX. **E y H.** Útero del grupo OVX+TX. Las imágenes se observaron a 20X.

## 6. DISCUSIÓN

### *Ovariectomía como modelo de menopausia.*

La ovariectomía en ratonas es un procedimiento que se utiliza para generar bajas concentraciones de estrógenos, y se ha establecido que es un modelo para simular el estado de menopausia que sucede en los humanos (Haslam 2003). En el presente estudio, se observó en las ratonas ovariectomizadas el aumento de peso esperado, que coincide con otros estudios donde se ha encontrado que hay aumento de peso de las ratonas ovariectomizadas, por aumento del consumo de comida y disminución de la actividad motora (Shimomura, Shimizu et al., 2002), similar a lo que sucede en los humanos (Wade and Schneider 1992). Además, se observó disminución de la densidad uterina por la pérdida de estrógenos, los cuales tienen efecto uterotrófico. (Høegh-Andersen, Tankó et al., 2004) También se observaron alteraciones en el ciclo estral, ya que mientras una ratón hembra intacta pasa por las 4 etapas del ciclo estral (McLean, Valenzuela et al., 2012), en las hembras ovariectomizadas se presentaron solamente las etapas metaestro y diestro, etapas donde hay menor concentración de estrógenos; esto coincide con otros estudios realizados en ratas donde tras la ovariectomía, en el frotis vaginal se observaron células cornificadas y leucocitos correspondientes con la fase metaestro (Ng, Yong et al. 2010). La ovariectomía permitió evaluar los efectos agonistas del tamoxifeno en el útero, el tratamiento generó aumento de tamaño y presencia de hiperplasia uterina, por tal razón se podría considerar como un buen modelo para evaluar el efecto de los tratamientos hormonales que se usen en la menopausia, y para estudiar el efecto del tamoxifeno sobre el útero como agente uterotrófico y factor de riesgo para el desarrollo de cáncer de endometrio.

### *Efecto del tamoxifeno sobre útero y cérvix.*

Uno de los principales efectos adversos del tamoxifeno se presenta en el útero al actuar como agonista de los receptores de estrógenos (Senkus-Konefka, Konefka et al., 2004). En el presente estudio se observaron cambios histológicos en tejido uterino de ratonas tratadas con tamoxifeno, tales cambios fueron hiperplasia con dilatación de glándulas endometriales y consecuente aumento del tamaño uterino, este hecho coincide con estudios previos donde se administró tamoxifeno a un grupo de ratonas intactas y a otro de ratonas ovariectomizadas, durante 6 meses y se observó igualmente hiperplasia endometrial en los dos grupos (Sourla, Luo et al., 1997); teniendo en cuenta estos datos se puede plantear que la hiperplasia en el endometrio por el tratamiento con tamoxifeno es evidenciable a partir de los 3 meses en las ratonas ovariectomizadas mientras que en las intactas requiere más tiempo de tratamiento. En un estudio realizado previamente por Zamora 2013, el tratamiento de tres meses en ratonas intactas no generó cambios morfológicos en el útero.

En el cérvix el tamoxifeno generó inflamación en el tejido epitelial, lo que podría indicar de que tiene efecto agonista sobre los receptores de estrógenos, este efecto es mayor en mujeres las mujeres postmenopáusicas en las que aumentó la incidencia de la hiperplasia de células endocervicales, además de metaplasia y maduración del epitelio vaginal tras el tratamiento con tamoxifeno (Friedrich, Mink et al., 1998). En otros casos se observó una alta incidencia de atipias reactivas o células escamosas atípicas de significado indeterminado, (ASCUS) sin incremento de displasia o cáncer cervical (Gill, Simpson et al. 1998).

### *Expresión de EAG1 y receptores de estrógenos en útero y cérvix.*

El canal de potasio EAG1 se ha implicado en oncogénesis, progresión tumoral y es un indicador temprano de hiperproliferación celular; (Pardo, del Camino et al., 1999, Farías, Ocana et al., 2004, Ortiz, Montante-Montes et al. 2011). Este canal es modulado por estrógenos y tamoxifeno (Diaz, Ceja-Ochoa et al., 2009). La modulación se pudo observar en la expresión del canal EAG1 en el útero y el cérvix de ratonas ovariectomizadas en las cuales se presentó disminución de la expresión de EAG1, tanto en la proteína como el mRNA, esto podría explicarse por la baja concentración endógena de estrógenos generada por la OVX. La administración de tamoxifeno en estas condiciones de bajos estrógenos generó cambios en la expresión de EAG1 diferente para cada tejido: 1) en el útero se presentó un aumento de la expresión del mRNA y un aumento significativo en la presencia de la proteína en el tejido, principalmente en el epitelio glandular, el cual presentó cambios morfológicos significativos durante el tratamiento con tamoxifeno. 2) En el cérvix, el efecto del tamoxifeno fue diferente ya que la expresión del mRNA de EAG1 no cambió con el tratamiento, sin embargo, la expresión de la proteína se observó de manera diferente ya que tras la ovariectomía, la expresión disminuyó notablemente y con el tratamiento con tamoxifeno se presentó inflamación y presencia de la proteína en un nivel similar al control. La expresión de EAG1 en el grupo control probablemente se deba a la etapa del ciclo estral.

El tratamiento con tamoxifeno regula a la alta la expresión del canal EAG1 en mayor grado en el útero y en menor grado en el cérvix, lo que podría suceder porque los efectos agonistas del tamoxifeno son más frecuentemente y reportados en el útero y menores en el cérvix.

La regulación de la expresión de receptores de estrógenos por parte del tamoxifeno es también dependiente del tipo de tejido y del nivel endógeno de estrógenos. Se observó que tras la OVX, la expresión de ER $\alpha$  aumentó significativamente con respecto al control, a nivel de mensajero en el útero y el cérvix, y esto coincide con los estudios anteriores en las ratas donde mostraron que la OVX regula a la alta la expresión del mRNA del ER $\alpha$ , (Wang, Masironi et al., 1999; Mohamed and Abdel-Rahman 2000), este efecto no se observó en el grupo tratado con tamoxifeno. En cuanto a la expresión del ER $\alpha$  en el tejido, el efecto regulador es diferente ya que en cérvix, la OVX disminuyó levemente la expresión de la proteína y el tamoxifeno la aumentó, y en el útero, la OVX aumentó significativamente la expresión de ER $\alpha$  y el tamoxifeno la disminuyó levemente.

La expresión del ER $\beta$  también presentó una regulación diferente para cada tejido, en el cérvix, tras la ovariectomía la expresión del mRNA fue mayor a la de los controles pero la expresión de la proteína fue muy baja o nula. En el útero, el efecto fue diferente ya que con la ovariectomía la expresión del mensajero fue igual a los controles, pero tras el tratamiento con tamoxifeno aumentó la expresión del ER $\beta$ , y la expresión de la proteína aumentó levemente, esto se puede explicar debido a que se conoce que el ER $\beta$  actúa como un represor de los ER $\alpha$  y en el útero es modulador negativo de estos receptores (Weihua, Saji et al. 2000), de tal forma que mientras se observó elevada la expresión de ER $\alpha$  en el útero, se encontró disminuida la expresión de ER $\beta$  y viceversa. Esta regulación no se dio en el cérvix, ya que ambos receptores (ER $\alpha$  y ER $\beta$ ) presentaron la misma regulación a la alta y a la baja a nivel de mensajero con la OVX y bajo el tratamiento con tamoxifeno.

El modelo de menopausia en ratones Balb/c con tratamiento de tamoxifeno por 3 meses, generó cambios en el útero y el cérvix debido al efecto agonista del tamoxifeno en estos tejidos como sucede en mujeres postmenopáusicas, así mismo se observó un aumento en la expresión EAG1, el cual está

asociado con proliferación celular, por lo tanto era de esperarse un aumento en la expresión de este canal. También se observó que tanto el modelo de menopausia como la administración del tamoxifeno, generó cambios en la expresión de los ER, aumentando la expresión del ER $\alpha$  tras la ovariectomía, debido posiblemente a que la disminución abrupta de estrógenos en el medio generó una sobreexpresión de los receptores para captar las pequeñas concentraciones de estos, y la administración de tamoxifeno generó cambios en la expresión de los receptores, permitiéndoles llegar a su nivel basal. Estos cambios no suceden de manera similar en los ER $\beta$ , una explicación para esto es que el tamoxifeno muestra diferentes respuestas cuando el receptor se une a diferentes sitios efectoros, y esta respuesta depende del subtipo de receptor y el tejido donde actúe, de tal forma que el tamoxifeno actúa principalmente modulando a los ER $\alpha$  vía AP-1 generando proliferación en útero (Weatherman, Clegg et al., 2001).

Los anteriores hallazgos, muestran que sería muy interesante estudiar la expresión del canal EAG1 y los ER $\alpha$  y ER $\beta$  en mujeres con cáncer de mama tratadas con tamoxifeno, a través de un estudio de células cervicales o en el útero, para evaluar el potencial papel del EAG1 como un marcador temprano de lesiones en el cérvix o el útero de mujeres bajo tratamiento y hacer una correlación entre esta expresión y las posibles lesiones proliferativas en el útero o el cérvix. De esta manera podría considerarse el uso de este canal como marcador temprano, no solo de cáncer cervicouterino, sino de alteraciones de las células de tejidos cercanos a partir de una muestra de citología.

## 7. CONCLUSIÓN

En conclusión se puede proponer que el canal EAG1 puede ser un indicador de riesgo en el útero cuando hay exposición a tamoxifeno en condiciones hipoestrogénicas, por ejemplo ratones ovariectomizados o pacientes postmenopáusicas tratadas con tamoxifeno, ya que se observa aumento de su expresión cuando hay exposición a tamoxifeno y hay cambios morfológicos en el útero específicamente en la hiperplasia uterina.

También se puede concluir que la ovariectomía y el tamoxifeno regulan la expresión de los receptores de estrógenos de manera específica para cada tejido.

## **8. PERSPECTIVAS**

- Estudiar la expresión del canal de potasio EAG1 en muestras de pacientes con cáncer de mama que hayan sido tratadas con tamoxifeno.
- Estudiar diferentes órganos de ratones donde tiene efecto el tamoxifeno para evaluar la expresión de canales iónicos.
- Realizar experimentos de inhibición del EAG1 para saber si tiene efectos preventivos en la hiperplasia causada por el tamoxifeno.

## 9. REFERENCIAS

1. Bauer, C. K. and J. R. Schwarz (2001). "Physiology of EAG K<sup>+</sup> channels." *The Journal of Membrane Biology* 182(1): 1-15.
2. Biegel, L. B., et al. (1998). "Effects of 17 $\beta$ -Estradiol on Serum Hormone Concentrations and Estrous Cycle in Female Crl:CD BR Rats: Effects on Parental and First Generation Rats." *Toxicological Sciences* 44(2): 143-154.
3. Cano, A. and C. Hermenegildo (2000). "The endometrial effects of SERMs." *Human Reproduction Update* 6(3): 244-254.
4. Diaz, L., et al. (2009). "Estrogens and human papilloma virus oncogenes regulate human ether-a-go-go-1 potassium channel expression." *Cancer Research* 69(8): 3300-3307.
5. Dickson, R. B. and M. E. Lippman (1995). "Growth factors in breast cancer." *Endocrine Reviews* 16(5): 559-589.
6. Doisneau-Sixou, S. F., et al. (2003). "Estrogen and antiestrogen regulation of cell cycle progression in breast cancer cells." *Endocrine-Related Cancer* 10(2): 179-186.
7. Farias, L. M., et al. (2004). "Ether a go-go potassium channels as human cervical cancer markers." *Cancer Research* 64(19): 6996-7001.
8. Fischer, A. H., et al. (2008). "Hematoxylin and eosin staining of tissue and cell sections." *CSH Protocols* 2008: pdb.prot4986.
9. Fisher, B., et al. (1998). "Tamoxifen for Prevention of Breast Cancer: Report of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 Study." *Journal of the National Cancer Institute* 90(18): 1371-1388.

10. Frahm, E. and U. Obst (2003). "Application of the fluorogenic probe technique (TaqMan PCR) to the detection of *Enterococcus* spp. and *Escherichia coli* in water samples." *Journal of Microbiological Methods* 52(1): 123-131.
11. Friedrich, M., et al. (1998). "Tamoxifen and proliferation of vaginal and cervical epithelium in postmenopausal women with breast cancer." *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 80(2): 221-225.
12. Gill, B. L., et al. (1998). "Effects of tamoxifen on the cytology of the uterine cervix in breast cancer patients." *Diagnostic Cytopathology* 19(6): 417-422.
13. Girish CH, V. P., R Mentham, C Babu Rao, S Nama. (2014). "A Review On Breast Cancer." *International Journal of Pharma and Bio Sciences* 4(2): 47-54.
14. Gisela, D.-H., et al. (1998). "Atlas of Endometrial Histopathology, Second Revised and Expanded Edition." *International Journal of Gynecologic Pathology* 17(1): 93-93.
15. Gruber, C. J., et al. (2002). "Production and Actions of Estrogens." *New England Journal of Medicine* 346(5): 340-352.
16. Hall, J. E. G. A. C. (2011). *Guyton and Hall textbook of medical physiology*. Philadelphia, Pa., Saunders/Elsevier.
17. Hall, J. M., et al. (2001). "The multifaceted mechanisms of estradiol and estrogen receptor signaling." *Journal of Biological Chemistry* 276(40): 36869-36872.
18. Haslam, S. Z. (2003). *Ovariectomized mouse model for human menopause*, Google Patents.

19. Hemmerlein, B., et al. (2006). "Overexpression of Eag1 potassium channels in clinical tumours." *Molecular Cancer* 5: 41.
20. Hillier, S. G., et al. (1994). "Follicular oestrogen synthesis: the 'two-cell, two-gonadotrophin' model revisited." *Molecular and Cellular Endocrinology* 100(1-2): 51-54.
21. Høegh-Andersen, P., et al. (2004). "Ovariectomized rats as a model of postmenopausal osteoarthritis: validation and application." *Arthritis Research & Therapy* 6(2): 1-12.
22. Idris, A. I. (2012). "Ovariectomy/orchidectomy in rodents." *Methods in Molecular Biology* 816: 545-551.
23. Kangas, L. (1992). "Agonistic and antagonistic effects of antiestrogens in different target organs." *Acta Oncologica* 31(2): 143-146.
24. Kato, S. (2001). "Estrogen receptor-mediated cross-talk with growth factor signaling pathways." *Breast Cancer* 8(1): 3-9.
25. Katzenellenbogen, J. A. and B. S. Katzenellenbogen (1996). "Nuclear hormone receptors: ligand-activated regulators of transcription and diverse cell responses." *Chemistry and Biology* 3(7): 529-536.
26. Matos, L. L., et al. (2010). "Immunohistochemistry as an important tool in biomarkers detection and clinical practice." *Biomark Insights* 5: 9-20.
27. McKenna, N. J., et al. (1999). "Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology." *Endocrine Reviews* 20(3): 321-344.
28. McLean, A. C., et al. (2012). "Performing vaginal lavage, crystal violet staining, and vaginal cytological evaluation for mouse estrous cycle staging identification." *Journal of Visualized Experiments* (67): e4389.

29. Mohamed, M. K. and A. A. Abdel-Rahman (2000). "Effect of long-term ovariectomy and estrogen replacement on the expression of estrogen receptor gene in female rats." *European Journal of Endocrinology* 142(3): 307-314.
30. Mourits, M. J., et al. (2001). "Tamoxifen treatment and gynecologic side effects: a review." *Obstetrics & Gynecology* 97(5 Pt 2): 855-866.
31. Ng, K. Y., et al. (2010). "Estrous cycle in ob/ob and ovariectomized female mice and its relation with estrogen and leptin." *Physiology & Behavior* 99(1): 125-130.
32. Nilsson, S., et al. (2001). "Mechanisms of Estrogen Action." *Physiological Reviews* 81(4): 1535-1565.
33. Ortiz, C. S., et al. (2011). "Eag1 potassium channels as markers of cervical dysplasia." *Oncol Rep* 26(6): 1377-1383.
34. Osborne, C. K. (1998). "Tamoxifen in the Treatment of Breast Cancer." *New England Journal of Medicine* 339(22): 1609-1618.
35. Pandya, S. and R. G. Moore (2011). "Breast development and anatomy." *Clinical Obstetrics and Gynecology* 54(1): 91-95.
36. Pardo, L. A., et al. (1999). "Oncogenic potential of EAG K(+) channels." *The EMBO Journal* 18(20): 5540-5547.
37. Pearce, S. T. and V. C. Jordan (2004). "The biological role of estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$  in cancer." *Critical Reviews in Oncology / Hematology* 50(1): 3-22.

38. Pedram, A., et al. (2002). "Integration of the non-genomic and genomic actions of estrogen. Membrane-initiated signaling by steroid to transcription and cell biology." *The Journal of Biological Chemistry* 277(52): 50768-50775.
39. Peepliwal, A. K. and P. Tandale (2013). "Breast Cancer in India: Etiology, Diagnosis and Therapy." *Research and Reviews: Journal of Medical and Health Sciences* 2(2): 31-42.
40. Pickar, J. H., et al. (2010). "SERMs: progress and future perspectives." *Maturitas* 67(2): 129-138.
41. Platet, N., et al. (2004). "Estrogens and their receptors in breast cancer progression: a dual role in cancer proliferation and invasion." *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 51(1): 55-67.
42. Rodriguez-Rasgado, J. A., et al. (2012). "Eag1 channels as potential cancer biomarkers." *Sensors (Basel)* 12(5): 5986-5995.
43. Senkus-Konefka, E., et al. (2004). "The effects of tamoxifen on the female genital tract." *Cancer Treatment Reviews* 30(3): 291-301.
44. Shimomura, K., et al. (2002). "Is leptin a key factor which develops obesity by ovariectomy?" *Endocrine Journal* 49(4): 417-423.
45. Singh, M. N., et al. (2007). "Tamoxifen: important considerations of a multi-functional compound with organ-specific properties." *Cancer Treatment Reviews* 33(2): 91-100.
46. Sommer, S. and S. A. W. Fuqua (2001). "Estrogen receptor and breast cancer." *Seminars in Cancer Biology* 11(5): 339-352.

47. Sourla, A., et al. (1997). "Morphological changes induced by 6-month treatment of intact and ovariectomized mice with tamoxifen and the pure antiestrogen EM-800." *Endocrinology* 138(12): 5605-5617.
48. Toniolo, P. G., et al. (1995). "A Prospective Study of Endogenous Estrogens and Breast Cancer in Postmenopausal Women." *Journal of the National Cancer Institute* 87(3): 190-197.
49. Tortora, G. J. D. B. (2011). *Principles of anatomy and physiology*. Hoboken, N.J., Wiley.
50. Wade, G. N. and J. E. Schneider (1992). "Metabolic fuels and reproduction in female mammals." *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 16(2): 235-272.
51. Wang, H., et al. (1999). "A comparative study of estrogen receptors alpha and beta in the rat uterus." *Biology of Reproduction* 61(4): 955-964.
52. Weatherman, R. V., et al. (2001). "Differential SERM activation of the estrogen receptors (ER $\alpha$  and ER $\beta$ ) at AP-1 sites." *Chemistry & Biology* 8(5): 427-436.
53. Weihua, Z., et al. (2000). "Estrogen receptor (ER) beta, a modulator of ERalpha in the uterus." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97(11): 5936-5941.
54. WHO. (2008). "World cancer factsheet." from [http://publications.cancerresearchuk.org/downloads/Product/CS\\_FS\\_WORLD\\_A4.pdf](http://publications.cancerresearchuk.org/downloads/Product/CS_FS_WORLD_A4.pdf).
55. Wong, M. L. and J. F. Medrano (2005). "Real-time PCR for mRNA quantitation." *Biotechniques* 39(1): 75-85.

56. Yang, Y. J., et al. (2001). "The small blue cell dilemma associated with tamoxifen therapy." *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 125(8): 1047-1050.

57. Zamora, C. (2013). Expresión del canal EAG1, receptores a estrogénos alfa y beta en útero, cervix y ovarios de ratones tratados con tamoxifeno. Tesis de maestría Departamento de farmacología. México, DF, Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico nacional. CINVESTAV.

## 10. REFERENCIAS DE INTERNET

### Página WEB

File:Effects of estrogen. [Autor n.d.]. Health Encyclopedia. [Acceso 10/10//2014], de <http://www.urmc.rochester.edu/Encyclopedia/GetImage.aspx?ImageID=125600>.

File: Estrogen receptor action. [Autor Riggs, B. L. and L. C. Hartmann]. Health New England Journal of Medicine. [Acceso 10/10//2014], de <http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJM200303203481230>