



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**UNIDAD ZACATENCO
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA**

EXPRESIÓN DE EAG Y LOS RECEPTORES A ESTRÓGENO ALFA
Y BETA EN OVARIO, ÚTERO Y CÉRVIX DE RATONES
TRATADOS CON TAMOXIFENO.

TESIS

QUE PRESENTA:

Q.F.B. DULCE CAROLINA ZAMORA DÍAZ

PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE:
FARMACOLOGÍA

DIRECTOR DE TESIS:
DR. FRANCISCO JAVIER CAMACHO ARROYO

MÉXICO, D.F.

DICIEMBRE, 2013

Este proyecto se realizó en el laboratorio 13 del Departamento de Farmacología en el Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional.

Parte de este proyecto fue financiado por el donativo de CONACYT No.141126 para JC.

Agradezco a CONACYT por el apoyo económico brindado durante mis estudios de maestría con No. de Becario 270347 y No. de apoyo 333642.

AGRADECIMIENTOS

Gracias a mi familia por el apoyo, consejos, motivación y cariño que fueron indispensables para que pudiera terminar esta etapa.

A Iván por siempre apoyarme y no dejar que me rindiera en ningún momento.

A mis amigos de generación quienes compartieron conmigo toda esta etapa llena de retos, cambios, alegrías, tristezas, problemas pero sobre todo diversión, gracias por su amistad y estoy segura de que cada uno cumplirá sus metas.

Al Dr. Javier Camacho por aceptarme en su laboratorio, además del apoyo, consejos, la paciencia y dirección de este trabajo, que me ayudaron a aprender cosas nuevas y reforzar algunas otras.

A la Dra. Liliana Favari y la Dra. Esther López-Bayghen por el tiempo que dedicaron para leer este trabajo, además de los comentarios y sugerencias durante todo el proyecto que me permitieron mejorarlo.

A Elizabeth Hernández, Eunice Vera y Guadalupe Montiel por su apoyo técnico, consejos y ayuda durante todo el proyecto.

A todas mis compañeras en el laboratorio 13 de Farmacología por sus consejos, sugerencias, comentarios y sobre todo por su amistad.

A todos mis amigos y personas que contribuyeron de alguna manera en este trabajo.

ÍNDICE GENERAL

Índice De Figuras.....	iv
Índice De Tablas	v
Resumen	vi
Abstract.....	vii
1. Marco Teórico	1
1.1 Estrógenos.....	1
1.2 Receptores a Estrógeno.....	1
1.2.1 Función de los Receptores a Estrógeno α y β	6
1.2.2 Receptores a Estrógeno y Cáncer	7
1.2.3 Coactivadores y Corepresores del RE	9
1.3 Tamoxifeno.....	12
1.3.1 Metabolismo del Tamoxifeno	13
1.3.2 Mecanismo de acción del Tamoxifeno	14
1.3.3 Otros efectos del Tamoxifeno	16
1.3.4 Diagnóstico de las enfermedades en el ovario, el útero y el cérvix.....	20
1.4 Canales Iónicos	20
1.4.1 Canal Eag	21
2 Justificación.....	26
3 Hipótesis.....	26
4 Objetivos	27
4.1 Objetivo General.....	27
4.2 Objetivos Particulares	27

5	Materiales y Métodos	28
5.1	Animales	28
5.2	Tratamiento	28
5.3	Muestreo	29
5.4	Sacrificio	29
5.5	PCR en Tiempo Real	29
5.5.1	Homogenizado de muestras	30
5.5.2	Extracción de RNA	30
5.5.3	Lectura de RNA	30
5.5.4	Tratamiento con DNasa	31
5.5.5	Síntesis de cDNA	31
5.5.6	PCR en Tiempo Real	32
5.6	Inmunohistoquímica	34
5.6.1	Inclusión en parafina	34
5.6.2	Cortes de tejido	35
5.6.3	Inmunohistoquímica	35
6	Resultados	37
6.1	Citologías vaginales	37
6.2	Fotografías de los órganos extraídos	39
6.3	Cérvix	40
6.3.1	PCR	40
6.3.2	Inmunohistoquímica	41
6.4	Útero	43
6.4.1	PCR	43
6.4.2	Inmunohistoquímica	44

6.5	Ovario	46
6.5.1	PCR.....	46
6.5.2	Inmunohistoquímica	47
7	Discusión.....	49
8	Conclusiones	53
9	Perspectivas.....	53
10	Bibliografía.....	54

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de los receptores a estrógeno α y β	3
Figura 2. Distribución de los receptores a estrógenos α y β en diferentes órganos.	4
Figura 3. Mecanismos de acción de los receptores a estrógenos.	5
Figura 4. Mecanismos de acción de los correpresores.	11
Figura 5. Metabolismo del tamoxifeno.	14
Figura 6. Efecto agonista y antagonista del tamoxifeno.....	16
Figura 7. Estructura del canal Eag1.....	22
Figura 8. Expresión de Eag1 en el tejido normal y en los tumores..	23
Figura 9. Inmunohistoquímicas de las citología vaginales.....	37
Figura 10. Porcentaje de los ratones hembra Balb/cJ control en las diferentes etapas del ciclo estral.....	38
Figura 11. Porcentaje de los ratones hembra Balb/Cj tratados con tamoxifeno en las diferentes etapas del ciclo estral.	38
Figura 12. Ovario, útero y cérvix extraídos de los ratones hembra Balb/cJ.....	39
Figura 13. Cerebro y cerebelo de los ratones Balb/cJ,	39
Figura 14. Hígado de los ratones hembra Balb/cJ,	39
Figura 15. Expresión relativa en el cérvix de ratones control y tratados con tamoxifeno. .	40
Figura 16. Inmunohistoquímicas de los tejidos de los ratones hembra Balb/cJ.....	41
Figura 17. Expresión de Eag1 a nivel de proteína.....	42
Figura 18. Expresión relativa en útero de ratones hembra Balb/cJ controles y tratados con tamoxifeno.....	43
Figura 19. Inmunohistoquímica de los tejidos de ratones hembra Balb/cJ.	44
Figura 20. Expresión a nivel de proteína de Eag1 en el útero de los ratones hembra Balb/cJ control.....	45
Figura 21. Expresión a nivel de proteína de Eag1 en el útero de ratones hembra Balb/cJ tratados con tamoxifeno (0.05mg/comprimido) por 90 días.	45
Figura 22. Expresión relativa en el ovario de los ratones hembra Balb/cJ controles y tratados con tamoxifeno.	46

Figura 23. Inmunohistoquímicas en los tejidos de ratón hembra Balb/cJ.....	47
Figura 24. Expresión a nivel de proteína de Eag1 en el ovario de los ratones hembra Balb/cJ controles.	48
Figura 25. Expresión a nivel de proteína de Eag1 en el ovario de los ratones hembra Balb/cJ tratados con tamoxifeno.	48

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Fenotipo de ratones knockout de los receptores a estrógeno.	6
Tabla 2. Principales coactivadores que regulan la transcripción del RE.....	10

RESUMEN

El tamoxifeno es uno de los tratamientos para cáncer de mama más utilizados en la actualidad. Sin embargo, se ha encontrado que el uso a largo plazo de tamoxifeno está asociado a diversas patologías en el ovario, el útero y cérvix. Los métodos actuales de detección de lesiones pre-malignas o malignas en estos órganos tienen una sensibilidad muy baja, es por ello que se necesitan nuevos marcadores que permitan la detección oportuna de estas alteraciones. En este sentido, se ha propuesto al canal de potasio éter à go-go (Eag1) como un marcador potencial para la identificación de las lesiones tempranas asociadas con el desarrollo del cáncer cervicouterino y en tejidos cercanos como el endometrio y el ovario. Encontrar un marcador temprano que permita detectar estas alteraciones ayudaría a tener métodos de diagnóstico más sensibles que permitan una detección y tratamiento oportuno. En este trabajo, se determinó la expresión de Eag1 por PCR en tiempo real e inmunohistoquímica, así como la expresión de los receptores a estrógeno α y β a nivel de RNAm en ratones hembra Balb/cJ, controles y tratados con un comprimido de tamoxifeno de 0.05 mg en ovario, útero y cérvix. Los resultados obtenidos muestran una tendencia de disminución de la expresión de Eag1, y un aumento de expresión en el receptor a estrógenos β en útero y cérvix, lo que indica que el resultado observado probablemente se deba al efecto antiestrogénico del tamoxifeno. El canal Eag1 está involucrado en la proliferación y la progresión tumoral, mientras que el RE β ha sido reportado al tener un efecto protector, regulando la actividad del RE α , el cual está involucrado en la proliferación celular. Estos resultados se explican por el modelo utilizado. La edad y el ambiente estrógeno en los ratones utilizados estarían favoreciendo el efecto antiestrogénico por lo menos en útero y cérvix, mientras que en ovario no se observó este efecto, ni cambio alguno en la expresión de estos genes. De acuerdo a estos resultados, se puede estimar que para observar el efecto agonista del tamoxifeno es necesario simular condiciones específicas en los ratones, específicamente en los niveles de estrógenos, ya que este efecto se observa en mujeres postmenopáusicas, es decir, con niveles bajos de estrógenos.

ABSTRACT

Tamoxifen is one of the most commonly used breast cancer treatments. However, it has been found that the long term use of tamoxifen is associated with various pathologies in the ovary, uterus and cervix. Current methods for detection of premalignant and malignant lesions in these organs have a very low sensitivity, this is why we need new markers that allow the detection of these alterations. In this regard, the potassium channel ether à go-go (Eag1) is a potential marker for identifying early lesions associated with cervical cancer development and alterations in the nearby tissues such as endometrium and ovary. Finding an early marker to detect these changes would help to have more sensitive diagnostic methods that allow early detection and timely treatment. In this work Eag1 expression was determined by real-time PCR and immunohistochemistry, and the expression of estrogen receptors α and β by real-time PCR in the ovary, uterus and cervix of female Balb/cJ mice treated with a pellet of tamoxifen (0.05 mg) or without treatment. The results showed a decreasing trend of Eag1 expression and increased expression of estrogen receptor β in uterus and cervix, which indicates that this is probably due to the antiestrogenic effect of tamoxifen. Eag1 channel is involved in proliferation and tumor progression, whereas the RE β has been reported to have a protective effect by regulating RE α activity, which is involved in cell proliferation. These results might be explained by the model used in this work. The age and estrogenic environment in the mice would favor the anti-estrogenic effect of tamoxifen at least in the uterus and cervix (in ovary this effect was not observed). According to these results, the agonistic effect of tamoxifen might be observed in specific conditions in mice, specifically at some estrogen levels, since this effect is observed in postmenopausal women, namely at low levels of estrogens.

1. MARCO TEÓRICO

1.1 ESTRÓGENOS

Los estrógenos pertenecen a la familia de las hormonas esteroides, las cuales ejercen una gran variedad de efectos sobre el crecimiento, desarrollo y diferenciación de diferentes tejidos. La acción reguladora primaria de los estrógenos está restringida principalmente a los órganos reproductivos; sin embargo, pueden regular otros procesos en tejidos como el hueso, el hígado, el sistema cardiovascular y el cerebro.¹

1.2 RECEPTORES A ESTRÓGENO

La expresión de los receptores de las hormonas esteroides sexuales como los receptores de estrógeno (RE) α y β juega un papel importante en la regulación del ciclo celular. Estos receptores son factores de transcripción regulados por ligando, su acción está determinada por la cooperación y la competencia entre los subtipos de receptores de estrógenos, correguladores y otros factores de transcripción.²

Los receptores de estrógenos α y β son miembros de la superfamilia de receptores nucleares de factores de transcripción. Otros miembros de esta familia incluyen receptores de la hormona tiroidea, la vitamina D, el ácido retinoico, y otros receptores de esteroides, tales como el de los glucocorticoides, los andrógenos, la progesterona y los mineralocorticoides.³

El RE α fue el primer receptor de estrógenos clonado, se aisló de las células MCF-7 de cáncer de mama humano a finales de 1980. De acuerdo con su papel como factor de transcripción, se localiza principalmente en el núcleo. Hasta hace pocos años se pensaba que todos los efectos debidos a estrógenos eran mediados por un solo RE, sin embargo, en 1996 fue descubierto un nuevo receptor que comparte gran homología con el RE conocido

y se decidió denominarlos entonces RE β . Los RE α y RE β son productos de los genes en diferentes cromosomas (locus 6q25.1 y locus 14q23-24.1, respectivamente).^{3,4}

Ambos receptores contienen 6 dominios funcionales, similares a los de otros miembros de la superfamilia de receptores esteroideos, denominados de la A-F (Figura 1). Ambos tienen un dominio central de unión al DNA (DBD) muy conservado que se compone por dos “dedos de zinc”, se une a secuencias específicas en el promotor o a los sitios “enhancer” de genes regulados por estrógenos. La región carboxilo-terminal del receptor constituye el dominio de unión a ligando (LBD) el cual reconoce a los estrógenos naturales como 17 β -estradiol (E2) y a ligandos sintéticos que pueden ser antagonistas totales o SERM’s (Moduladores Selectivos de los Receptores a Estrógenos), que pueden activar o inhibir al receptor dependiendo del contexto celular y del promotor. Adicionalmente, el LBD contiene una región de localización nuclear, regiones de homodimerización y un dominio de transactivación denominado AF-2 (Función Activadora 2), el cual es dependiente de ligando. La interacción con E2 activa al receptor promoviendo una serie de cambios conformacionales que incluyen dimerización, localización nuclear y muy importantemente una activación de la región AF-2 que promueve su interacción con coactivadores transcripcionales. Entre el DBD y el LBD existe una región variable denominada bisagra, la cual tiene una secuencia de localización nuclear.^{1,4,5}

La región amino-terminal es la más variable entre los miembros de la familia, tanto en tamaño como en secuencia de aminoácidos, y contiene una región de transactivación denominada AF-1 (Función Activadora 1), la cual es ligando-independiente. Las regiones AF-1 y AF-2 pueden activar la transcripción de manera independiente o sinérgica dependiendo del contexto celular y del promotor.

Por último, en la región N-terminal existen diversos sitios de fosforilación, que son regulados por una variedad de proteínas cinasas. El papel que tiene la fosforilación en la actividad de los receptores nucleares no está completamente definido, pero probablemente está involucrada en la modulación de la actividad de AF-1 y su interacción con correguladores, así como en la comunicación con otras vías de transducción de señales. Se ha visto que la fosforilación del RE puede relacionarse con su unión a sus elementos de

respuesta a estrógenos. Todos los receptores de esteroides, incluyendo el ER β , son fosforilados después de la unión a sus ligandos respectivos.^{1,4-6}

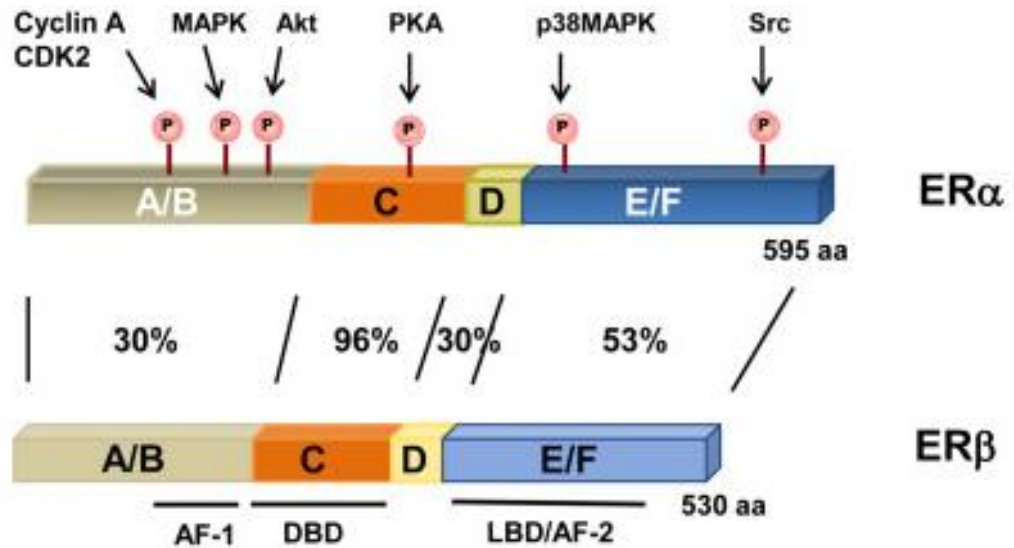


Figura 1. Estructura de los receptores a estrógeno α y β . Ambos receptores tienen 6 dominios funcionales, denominados de la A-F, con homología variable entre ellos. Tomado de la Ref. 7.

La localización y los niveles de expresión del RE α y RE β dependen del tejido y de la célula de que se trate. El RE β se ha detectado principalmente en el ovario, colon, cerebro, trompa de falopio, pulmón, tejido adiposo, riñón, hueso, corazón, vejiga, glándula suprarrenal, testículos y próstata, mientras que el RE α ha sido encontrado predominantemente en los testículos, el epidídimo, el ovario, la glándula mamaria, el cerebro (glándula pituitaria), el tejido adiposo, el hueso, el corazón, y el útero como se muestra en la figura 2.^{3,6,8}

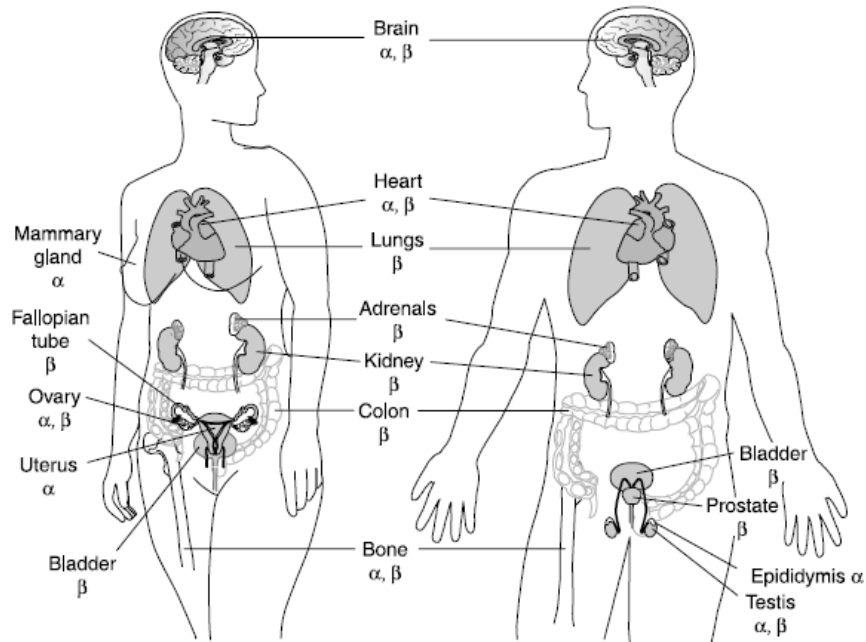


Figura 2. Distribución de los receptores a estrógenos α y β en diferentes órganos. El RE α se encuentra principalmente en ovario, testículos, mama, cerebro, hueso, corazón y útero; mientras que el RE β se localiza principalmente en ovario, colon, cerebro, riñón, corazón, hueso, vejiga, próstata, pulmón y glándula suprarrenal. Tomado de la Ref. 8.

Actualmente, se reconocen cuatro mecanismos mediante los cuales el receptor de estrógenos regula el crecimiento y la proliferación celular, ejemplificados en la figura 3:

Activación dependiente del ligando: los estrógenos difunden al interior de la célula y se unen a los receptores a estrógeno que se encuentran en el núcleo. Este complejo estrógeno - RE nuclear se une al elemento de respuesta a estrógenos en la región promotora de los genes sensibles a los estrógenos, lo que resulta en el reclutamiento de las proteínas correguladoras (coactivadores o correpresores) para el promotor promoviendo la transcripción de genes.^{1, 6}

Activación independiente de ligando: varias cinasas de las vías de señalización de los factores de crecimiento logran activar al RE y sus proteínas correguladoras en ausencia de ligando. La activación de RE α a través de la fosforilación en múltiples sitios (S104, S106, S118, S167, S236, Y537) por diversas cinasas es importante debido a la interacción entre el factor de crecimiento de señalización y del RE. El aumento en la señalización del factor de crecimiento puede explicar la pérdida de la dependencia de E2, produciendo de

este modo tumores resistentes a antiestrógenos. Aunque la relación exacta entre la fosforilación del RE y el resultado clínico que queda por esclarecer, el estado de fosforilación de RE tiene el potencial de ser un biomarcador predictivo y un blanco terapéutico.^{1,3}

Activación independiente de la unión del complejo hormona-receptor a su elemento de respuesta específico sobre el DNA: el RE unido a su ligando puede activar promotores mediante su unión a otros factores de transcripción, como AP-1, SP-1, utilizando los sitios de unión a DNA de éstos y promoviendo la transcripción de genes.^{1,9}

Señalización no-genómica: activación de otras cascadas de transducción de señales por medio de un receptor a estrógeno anclado a la membrana (GPR30). Diversas vías de señalización se activan por la unión de E2 al GPR30. Estos eventos rápidos se pueden clasificar en cuatro principales cascadas de señalización: la fosfolipasa C (PLC) / proteína cinasa C (PKC), la vía Ras / Raf / MAPK, la vía fosfatidil inositol 3 cinasa (PI3K) / AKT, y la vía AMPc / proteína cinasa A (PKA).^{1,10}

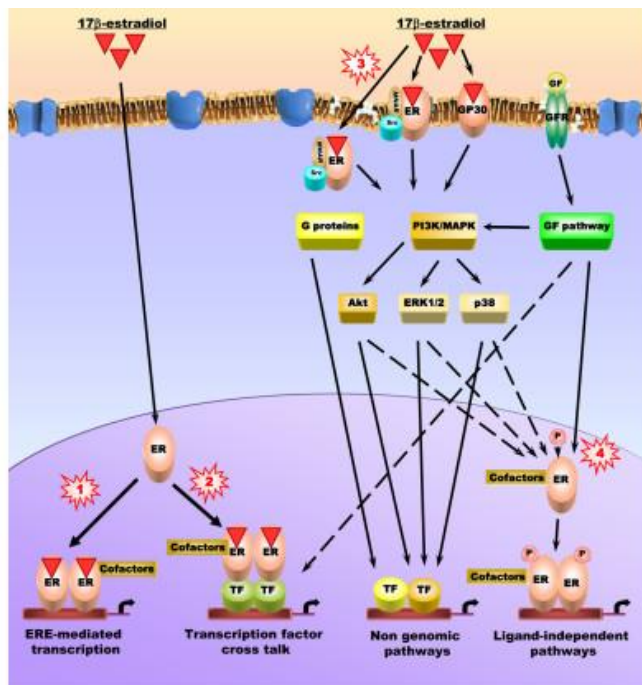


Figura 3. Mecanismos de acción de los receptores a estrógenos. Existen 4 mecanismos: activación dependiente de ligando, activación independiente de ligando, activación independiente de la unión al elemento de respuesta a estrógenos y señalización no genómica. Tomado de la Ref. 7.

1.2.1 FUNCIÓN DE LOS RECEPTORES A ESTRÓGENO α Y β

Funcionalmente, ambos receptores comparten varias características en común, ya que ambos unen al estradiol (E2) y a moléculas relacionadas como los SERM's. Además, reconocen y se unen a los elementos de respuesta a estrógenos para promover la transcripción de genes. Sin embargo, se ha reportado que el RE β tiene una actividad transcripcional más débil en respuesta a E2 en comparación con el RE α . El RE β también parece no presentar la respuesta agonista del tamoxifeno. Recientemente, el RE α , pero no el RE β , demostró que se une y activa la transcripción a partir del elemento de respuesta SF1 (Factor esteroideogénico 1), demostrando diferencias funcionales entre los dos receptores.¹¹

En este sentido, los ratones transgénicos son modelos experimentales valiosos para proporcionar una comprensión básica en las funciones normales de los genes durante el desarrollo y también durante la madurez. La tabla 1 resume los fenotipos en diferentes órganos de ratones knockout para los dos tipos de receptores, resaltando su papel en el desarrollo, la maduración y la función del sistema reproductor femenino y masculino.^{3,4}

Tabla 1. Fenotipo de ratones knockout de los receptores a estrógeno. Modificado de la Ref. 3.

	REKO α , RE β dominante		REKO β , RE α dominante		REOK $\alpha\beta$	
	Hembras	Machos	Hembras	Machos	Hembras	Machos
Tracto reproductivo	Infértil Útero hipoplásico. Foliculos quísticos y hemorrágicos. No hay cuerpo lúteo. Disminución de células de la granulosa en ovario.	Reducción de la fertilidad. Disminución del conteo de espermas. Disminución de la motilidad de los espermas. Disminución del tamaño de los testículos	Fertilidad reducida Útero normal. Muchos foliculos atreticos Disminución del cuerpo lúteo en el ovario.	Fértil Hiperplasia epitelial en los conductos colectores de la próstata y en la pared de la vejiga.	Infértil Útero hipoplásico. Desarrollo de estructuras similares a los tubulos seminíferos de los machos en ovario	Infértil Disminución del número de espermas Disminución de la motilidad de los espermas.
Glándula mamaria	Desarrolla una estructura de recién nacido No hay desarrollo de pubertad	N/A	Normal	N/A	N/A	N/A
Comportamiento sexual	No receptividad	Pocas eyaculaciones. No montaje.	Normal	Normal		No hay eyaculación, no montaje.
Hueso	Disminución de la densidad ósea	Disminución de la densidad ósea	Normal	Normal		

N/A No aplica

Además, los estrógenos regulan la homeostasis ósea, tanto en hombres como en mujeres. La osteoporosis es debido al aumento de la resorción ósea tanto en mujeres como en hombres y se asocia con la deficiencia de estrógenos. Los estrógenos inhiben el recambio óseo mediante la reducción de la resorción ósea mediada por los osteoclastos e incrementando la formación ósea mediada por osteoblastos.¹²

Existen reportes en donde los estrógenos y sus receptores proporcionan un efecto protector contra enfermedades neurodegenerativas en seres humanos. Específicamente, se ha observado que tienen un efecto neuroprotector en enfermedades tales como el accidente cerebrovascular, enfermedad de Parkinson, y la enfermedad de Alzheimer.¹²

1.2.2 RECEPTORES A ESTRÓGENO Y CÁNCER

Cáncer de mama

Los estrógenos juegan un papel central en el desarrollo del cáncer de mama, siendo el RE α el más importante predictor de pronóstico del cáncer de mama, donde el aumento de la supervivencia está relacionado con la expresión de RE α , ya que estos tumores responden a la terapia antiestrógenica.¹³

El RE β ha surgido como un marcador potencial para predecir la respuesta a la terapia hormonal del cáncer de mama. Análisis inmunohistoquímicos de la expresión RE β del cáncer de mama invasivo, incluyendo el cáncer de mama triple negativo, concluyeron que la presencia de RE β se asocia a una mejora significativa de la supervivencia, principalmente en las mujeres posmenopáusicas. Además, se ha reportado que en el tejido tumorigénico, la expresión de RE α aumenta, mientras que la expresión del RE β disminuye.^{3, 6}

También, se ha reportado que diversas variaciones en la secuencia o polimorfismos de un solo nucleótido en el gen RE α están asociadas con un aumento o una disminución del riesgo de cáncer de mama. Por otra parte, dos polimorfismos de nucleótido único en el gen

RE β están asociados con un mayor riesgo de cáncer de mama en las mujeres posmenopáusicas, pero no en las mujeres premenopáusicas.⁴

Cáncer de ovario

Aunque aproximadamente dos tercios de los cánceres de ovario son RE positivo, las respuestas a la terapia endocrina no son tan favorables. Sin embargo, los anticonceptivos que combinan estrógenos y progestágenos disminuyen el riesgo de cáncer de ovario, de tal manera que 5 años de uso de los anticonceptivos confieren una reducción del riesgo del 50% que persiste durante al menos 10 años después de la suspensión de su uso.^{3,4}

El RE β es predominante en el ovario, se encuentra en las células de la granulosa, mientras que RE α se localiza a las células de la teca e intersticial. Existe controversia sobre el papel de los receptores en el desarrollo del cáncer de ovario, sin embargo, la mayoría de los estudios apoyan un escenario en el que RE α se convierte en el RE dominante en el cáncer de ovario. Esto implica un mecanismo en el que la sobreexpresión de RE α le confiere una ventaja de crecimiento selectivo de las células.³

RE β parece ejercer acciones supresoras de tumores en el desarrollo del cáncer de ovario, ya que la pérdida de la expresión RE β ha demostrado tener un gran impacto sobre la proliferación, la apoptosis y la motilidad de las células del cáncer de ovario. Además, una disminución en la expresión de RE β en el cáncer de ovario epitelial está asociado con la severidad y pronóstico de la enfermedad.^{8, 14}

Cáncer endometrial

El cáncer de endometrio es el cáncer ginecológico más común donde uno de los factores de riesgo es la exposición a los estrógenos. Aproximadamente, el 70-80% de los

carcinomas endometriales esporádicos se distinguen como carcinomas de tipo I y se asocia con la hiperplasia endometrial, el hiperestrogenismo, y la expresión de RE. El 20% restante lo constituyen los carcinomas de tipo II, que están relacionados con los estrógenos, y muestran la expresión de RE negativo o bajo.^{4, 12, 13}

Ambos RE se expresan en el endometrio normal, pero los niveles de RE β se han reportado como inferiores a los de RE α . Se cree que el RE α participa al mediar el efecto proliferativo de los estrógenos tanto en el ciclo endometrial como en la patogénesis de las enfermedades proliferativas endometriales.¹⁴

Los análisis de los carcinomas endometriales por microarreglos de tejidos, la hibridación *in situ* fluorescente (FISH), y la inmunohistoquímica demuestran que la amplificación de la RE α está relacionada con el cáncer en estadio temprano, pero por el contrario, la ausencia de RE α se correlaciona con la muerte por esta enfermedad.¹³

En diversos estudios no se observa la pérdida de la expresión RE β en la tumorigénesis endometrial, pero se ha sugerido que el RE β tiene propiedades en el desarrollo de tumores en el cáncer de endometrio. En la mayoría de los casos, se encontró la expresión de ER β 1 y ER β 2 sin cambios en el cáncer de endometrio en comparación con el endometrio sano, oponiéndose a los hallazgos anteriormente mencionados en el ovario y el cáncer de mama. Dada la controversia que existe sobre el papel de los receptores a estrógenos en este tipo de cáncer, aún quedan estudios por realizar para esclarecer su papel en el desarrollo del cáncer endometrial.¹⁴

1.2.3 COACTIVADORES Y COREPRESORES DEL RE

La regulación transcripcional implica interacciones ordenadas y complejas proteína-proteína entre el receptor, los coreguladores y la maquinaria transcripcional. Los coreguladores pueden dividirse en dos tipos, los coactivadores y los corepresores.^{15, 16}

Los coactivadores, por definición, no interactúan directamente con el DNA pero lo hacen de manera indirecta a través de su asociación con factores de transcripción, entre los que se encuentra el receptor de estrógenos.^{1, 16}

Los coactivadores usualmente se presentan en complejos multiproteicos que interactúan con factores de transcripción y modifican la cromatina para facilitar la transcripción, a través de mecanismos de remodelación de la cromatina, la acetilación y la metilación de histonas. Facilitan el reclutamiento de la maquinaria general de la transcripción y están involucrados en la activación de la polimerasa II, también actúan estabilizando los complejos sobre el DNA, así como la regulación del recambio de complejos proteicos sobre los promotores.¹ Algunos de los coactivadores involucrados en la regulación del receptor a estrógenos se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Principales coactivadores que regulan la transcripción del RE. Modificado de la Ref. 15.

NOMBRE	SITIO DE UNIÓN EN EL RE	MECANISMO DE REPRESIÓN	OTRAS FUNCIONES CELULARES
NCoR	LBD	HDACs	Represión de otros factores de transcripción
SMRT	LBD	HDACs	Represión de otros factores de transcripción
SHARP	(SMRT)	HDACs, competición con SRA	
SAFB1	DBD/bisagra	HDAC- dependiente e independiente	Unión a RNA y S/MAR, inhibición del crecimiento celular
SAFB2	ND	ND	Inhibición del crecimiento celular
RIP140	LBD	HDAC-dependiente e independiente	
LCoR	LBD	HDAC-dependiente e independiente	
SHP	AF-2	Competición con coactivadores, inhibición de la dimerización de RE α	Inhibición de la síntesis de ácidos biliares.
DAX-1	AF-2	Competición con coactivadores. Inhibición de la dimerización de RE α	Cofactor para SF-1
COUP-TF	ND	Inhibición de la unión al DNA del RE α	Regulación negativa de diversos receptores nucleares
DP97	LBD/AF.2	ND	Helicasa de RNA dependiente de ATP
NSD1	LBD	ND	Actividad HMTasa
BCRA1	LBD/AF-2	Interacción con CtIP. Regulación a la baja de p300	Reparación del DNA, recombinación y transcripción
MTA1	AF-2	HDACs	Incremento de la metástasis, miembro del complejo NURD
MTA1s	AF-1, DBD, AF-2	Secuestra al RE α en el citoplasma	
RTA	AF-1	HDAC independiente	Unión a RNA
REA	LBD	Competencia con coactivadores	
FKHR	LBD	ND	Factor de transcripción que regula la apoptosis y el ciclo celular
TR2	DBD/bisagra, LBD/AF-2	Inhibición de la dimerización de RE α	Factor de transcripción, interacción con HDACs
NEDD8	ND	Proteólisis del RE α	
TAF-1 β	DBD/bisagra Dominio F	Disminución de la acetilación del RE α . Incremento de la unión del RE α -dna	Disminución de la acetilación de histonas y modulación de la estructura de la cromatina
Smad 4	AF-1	ND	Regulador transcripcional
p53	ND	Inhibición de la unión RE α con los estrógenos	Reparación de DNA, inhibición de la apoptosis y el crecimiento celular.

ND, no determinado

Los correpresores se definen como factores que interactúan con los receptores a estrógeno y disminuyen la actividad transcripcional del RE. Los correpresores forman parte de los complejos multiproteicos y reclutan desacetilasas de histonas (HDAC) que evitan el acceso a factores de transcripción críticos sobre el templado, y así se ve reprimida la transcripción.^{1, 15}

Existen otros represores que inhiben la actividad transcripcional de los receptores nucleares mediante diferentes mecanismos. Estos incluyen interrumpir la unión al DNA o la translocación al núcleo del receptor, inhibir las interacciones entre los receptores y sus coactivadores o interrumpir el reclutamiento de la maquinaria basal de transcripción.¹ Los principales mecanismos usados por los correpresores se ejemplifican en la figura 4:

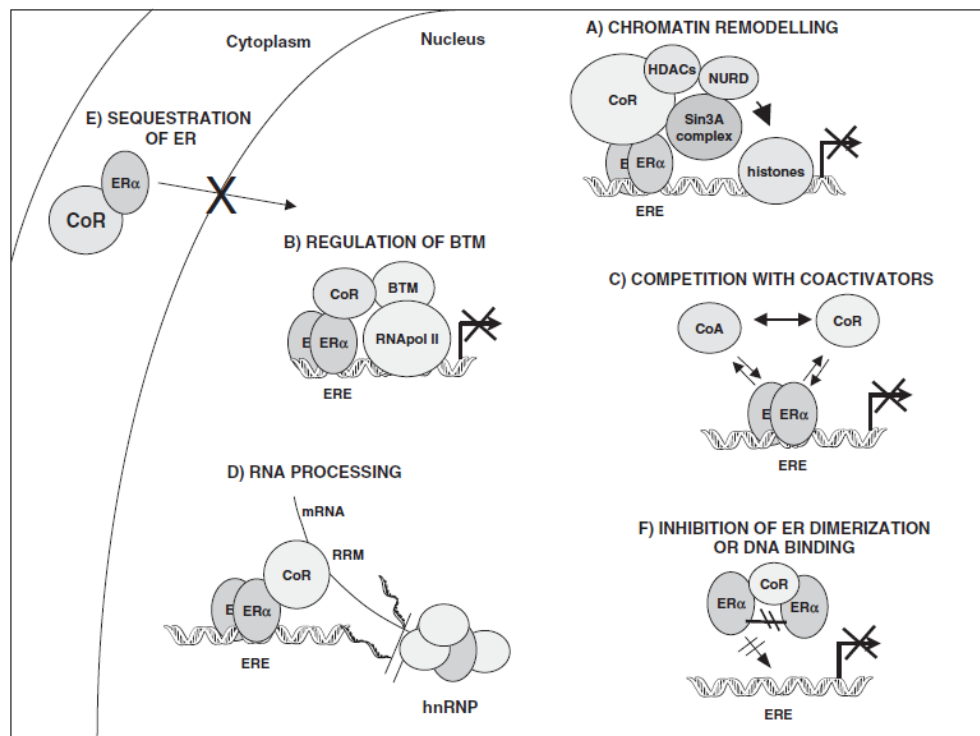


Figura 4. Mecanismos de acción de los correpresores. A) Remodelación de la cromatina, B) Interacción con la maquinaria basal de transcripción, C) Competición con coactivadores, D) Interferencia con el procesamiento de RNA, E) Secuestro del RE, F) Interferencia con la dimerización del RE o su unión al DNA. Tomado de la Ref. 15.

Muchos de los receptores nucleares reprimen la transcripción en ausencia de su ligando o en presencia de ligandos antagonistas, como el tamoxifeno. Esta regulación negativa está mediada en parte por los correpresores. La unión de antiestrógenos causa un cambio conformacional en AF-2 diferente al creado por la unión de los ligandos agonistas, lo cual bloquea la interacción con coactivadores de AF-2 y permite la entrada de correpresores.^{1, 17}

La expresión de algunos correpresores es muy alta en los tejidos que responden al estímulo hormonal. Por ejemplo, algunos correpresores como LCoR, RIP140, SAFB1/2, y FKHR, son abundantes principalmente en cerebro y en órganos reproductivos. Los correpresores presentan modificaciones postraduccionales como la fosforilación, la acetilación y la proteólisis. Además pueden translocarse del citoplasma al núcleo con facilidad y viceversa, lo que hace suponer que pueden controlar una amplia gama de procesos en el desarrollo fisiológico y metabólico.^{1, 18}

1.3 TAMOXIFENO

El tamoxifeno es un fármaco que pertenece a la familia de los moduladores selectivos de los receptores a estrógenos (SERM). Los SERM son fármacos no esteroideos de síntesis que pueden unirse de manera selectiva a los receptores de estrógenos para modular su respuesta e inducir así, según el tejido que se considere, efectos agonistas o antagonistas del estradiol (E2).¹⁹

El tamoxifeno se aprobó para su uso farmacéutico en los Estados Unidos en 1977 por la FDA y se ha registrado para su uso en más de 90 países. Es el tratamiento de primera línea en el cáncer de mama metastásico en mujeres postmenopáusicas. El tamoxifeno también se ha usado como terapia adyuvante para el tratamiento de las mujeres postmenopáusicas con cáncer de mama positivas a receptores de estrógeno y, desde principios de la década de 1990, para el tratamiento de las mujeres postmenopáusicas con cáncer de mama positivas a receptores de estrógeno y ganglios negativos. A finales de

1980 y principios de 1990, también se utiliza ampliamente en mujeres con carcinoma ductal *in situ* después de la cirugía de mama y radioterapia, además se utiliza para reducir el riesgo de cáncer de mama invasivo.²⁰

El tamoxifeno ha sido considerado como un agente quimioprotector para reducir la incidencia del cáncer de mama en mujeres catalogadas como de alto riesgo. Se ha utilizado como tratamiento de primera línea para el cáncer de mama masculino que responde a hormonas, y también como terapia adyuvante en este tipo de cáncer.²¹

Resultados del estudio del NSABP (National Surgical Adjuvant and Bowel Project), mostraron que el consumo preventivo de tamoxifeno reduce el riesgo de cáncer de mama invasivo en casi un 50%, además diversos estudios han observado que disminuye la mortalidad en un 20%, así como el cáncer de mama contralateral hasta en un 30%.^{19, 20, 22}

1.3.1 METABOLISMO DEL TAMOXIFENO

El tamoxifeno es considerado como un profármaco ya que necesita ser transformado a sus respectivos metabolitos, los cuales son los responsables de su actividad farmacológica. Este fármaco sufre un metabolismo primario y secundario, el cual se lleva a cabo en el hígado, principalmente por las enzimas del citocromo P450, de las cuales, estudios *in vitro* han demostrado que existen muchas isoformas de esta enzima implicadas en la transformación de tamoxifeno a sus metabolitos, como por ejemplo el CYP3A, el CYP2D6, el CYP2C9, el CYP2C19, el CYP2B6 y el CYP1A2.²³

El *N*-desmetiltamoxifeno es el metabolito más abundante, sin embargo, no es el responsable de la actividad de tamoxifeno; el metabolito 4- hidroxitamoxifeno representa menos del 10% de la oxidación primaria del tamoxifeno catalizada por las enzimas CYP3A4 y CYP3A5, sin embargo, se considera que su papel en el efecto farmacológico es muy importante ya que tiene un efecto antiestrogénico 100 veces superior al del tamoxifeno.²⁴

Nuevos estudios han demostrado que hay otro metabolito, el 4-hidroxi-*N*-desmetil tamoxifeno (endoxifeno) que es formado a partir de la oxidación de *N*desmetiltamoxifeno catalizada por la enzima CYP2D6. El endoxifeno es más importante que el 4-hidroxitamoxifeno ya que contribuye de manera más significativa al efecto anticanceroso del tamoxifeno, por lo tanto, responsable de la actividad de este fármaco.²⁴ Estas vías quedan ejemplificadas en la figura 5.

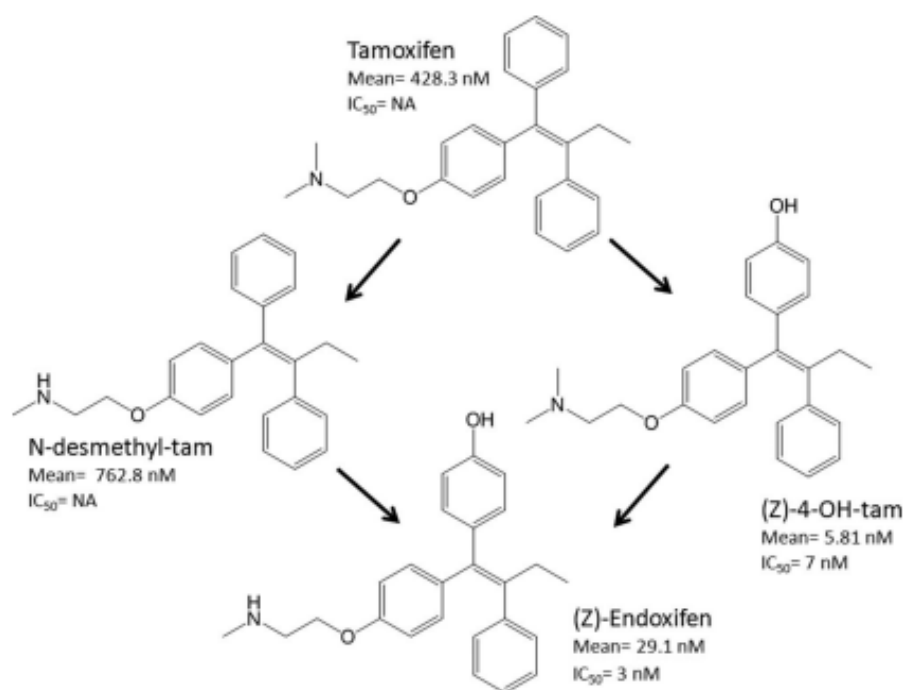


Figura 5. Metabolismo del tamoxifeno. El tamoxifeno tiene 3 metabolitos principales *N*-desmetiltamoxifeno, 4-hidroxitamoxifeno y el endoxifeno, este último es el responsable en mayor medida de la actividad anticancerosa del fármaco. Tomado de la Ref. 24.

1.3.2 MECANISMO DE ACCIÓN DEL TAMOXIFENO

El efecto de los estrógenos es mediado por 2 receptores conocidos como Receptor a estrógenos alfa y beta (RE α y RE β). Los estrógenos se unen en el dominio LDB (*ligand binding domain*), lo cual origina la liberación de las proteínas llamadas chaperonas y se

induce un cambio en la configuración del receptor, que a su vez permite su unión a la región promotora del gen diana, responsable de la actividad reguladora del gen.¹

Una vez que el receptor estrogénico dimerizado se ha unido al ligando, se produce el reclutamiento de las proteínas adicionales llamadas correguladoras, que disparan la activación o la represión de los genes específicos.¹

El tamoxifeno puede presentar un efecto agonista o antagonista dependiendo del tejido (Figura 5). Compite con los estrógenos por la unión a los receptores a estrógenos y evita que el complejo formado por los estrógenos y el receptor de estrógeno induzca la transcripción de genes, la síntesis de ADN, y por lo tanto, la proliferación celular. Se evita el paso de la fase G1 a S del ciclo celular, y se reduce el número de las células en la fase S, y G2-M.²⁵

Este efecto antagonista se explica porque no activan al receptor de estrógenos ya que bloquean por la inhibición competitiva la función de estos, pues se unen a ellos con similar afinidad que los estrógenos, disocian las proteínas chaperonas, producen dimerización del receptor, sin embargo, no se activa AF-2 ni se da el reclutamiento de proteínas correguladoras requeridas para la activación transcripcional.¹

Estudios indican que el tamoxifeno disminuye los tumores mamarios por la disminución de la proliferación celular y el aumento de las células apoptóticas. Las alteraciones en la proliferación celular y la apoptosis se asocian con la disminución en la expresión de la ciclina D1 y la ciclina E.²⁶

El efecto agonista del tamoxifeno se explica porque activa la vía alternativa de AP-1, la cual promueve la activación de los genes diana por un mecanismo no claro, pero que requiere la presencia constante de la función AF-1 en el dominio A/B, así como de las proteínas corregulatorias.^{19,27}

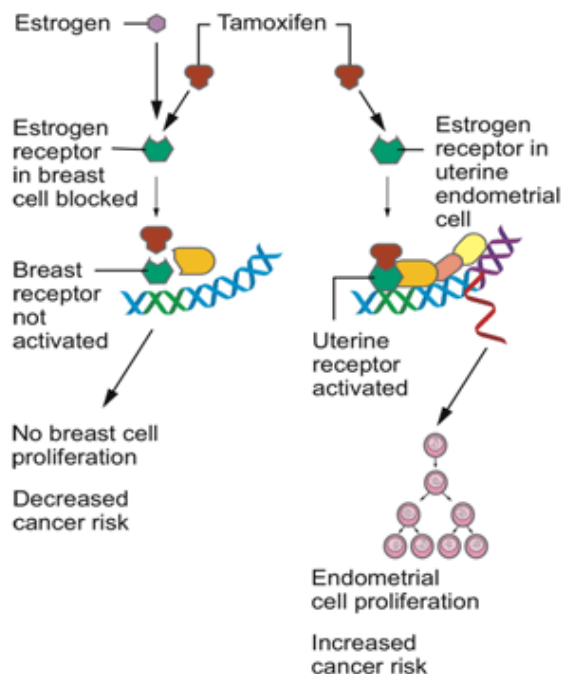


Figura 6. Efecto agonista y antagonista del tamoxifeno. En mama, el tamoxifeno tiene un efecto antagonista, bloqueando al receptor a estrógenos y evitando la transcripción de genes, mientras que en tejidos como el endometrio el tamoxifeno actúa como agonista, activando al receptor y provocando la transcripción de genes involucrados en la proliferación. Tomada de la Ref. 28.

1.3.3 OTROS EFECTOS DEL TAMOXIFENO

1.3.3.1 EFECTOS EN ÚTERO

Se ha encontrado que la frecuencia de las patologías endometriales son significativamente mayores entre las pacientes postmenopáusicas con cáncer de mama tratadas con tamoxifeno, en comparación con las pacientes postmenopáusicas sin cáncer de mama postmenopáusicas, donde se ha encontrado que las patologías endometriales están asociados con altas dosis acumulativas de tamoxifeno administradas a las pacientes postmenopáusicas con cáncer de mama.²⁹

Engrosamiento endometrial

Se ha observado un aumento en la incidencia del engrosamiento endometrial secundario en más del 50% en aquellas pacientes postmenopáusicas con cáncer de mama que consumen tamoxifeno comparado con las mujeres no tratadas.²⁹

Pólipos endometriales

Los pólipos endometriales son la patología endometrial más común reportada en asociación con la exposición al tamoxifeno. La incidencia en las mujeres tratadas con el tamoxifeno está entre el 8 y el 36%, frente al 0- 10% en las mujeres no tratadas.^{29, 30}

Los pólipos relacionados con el tamoxifeno son diferentes de los pólipos en la población general. Estos tienden a ser más grandes con un diámetro medio de 5 cm frente a 0.5- 3.0 cm, en la población general. Microscópicamente, los pólipos relacionados con el tamoxifeno contienen una combinación de la actividad proliferativa, la diferenciación epitelial aberrante, y la condensación focal del estroma periglandular.³⁰ Además, se ha reportado una alta tasa de transformación maligna en los pólipos endometriales de las pacientes postmenopáusicas con cáncer de mama tratadas con tamoxifeno.²⁹

Hiperplasia endometrial

La incidencia de la hiperplasia endometrial en la población general es del 0-8%, sin embargo, esta se incrementa en las mujeres posmenopáusicas con cáncer de mama tratadas con tamoxifeno. La incidencia es de 1.3-20% en estas pacientes, en comparación con el 0-10% en las pacientes postmenopáusicas con cáncer de mama que no están recibiendo tamoxifeno.^{29, 30}

La hiperplasia endometrial se diagnostica con mayor frecuencia en las pacientes postmenopáusicas con cáncer de mama que consumen tamoxifeno y que además presentan sangrado vaginal en comparación con las pacientes sin este síntoma.²⁹

Carcinoma endometrial

Uno de los efectos secundarios más importantes y perjudiciales del tratamiento con el tamoxifeno parece ser su efecto proliferativo sobre el endometrio, provocando una alta tasa de patologías endometriales incluyendo la hiperplasia, los pólipos, el carcinoma y los tumores mesodérmicos mixtos malignos.²⁵

Varios estudios han mostrado un aumento del riesgo relativo de desarrollar cáncer de endometrio de 1.3 a 7.5 veces. El riesgo de desarrollar cáncer de endometrio aumenta con la duración del tratamiento, principalmente cuando se extiende más allá de 5 años, siendo acumulativo con la dosis de tamoxifeno, así como la terapia de reemplazo de estrógeno, la obesidad, y la presencia de condiciones patológicas endometriales pre-existentes. Además, el riesgo de desarrollar cáncer endometrial no disminuye después del término del tratamiento con tamoxifeno, ya que el efecto puede durar varios años más después de suspenderlo.^{25, 29, 30}

Atrofia endometrial quística

La incidencia de atrofia endometrial quística se incrementa 3-4 veces en las mujeres tratadas con tamoxifeno en comparación con la población general.³⁰

Tumor mesodérmico mixto maligno

Diversos estudios muestran una incidencia más alta de tumores mesodérmicos mixtos malignos y sarcoma entre las pacientes postmenopáusicas con cáncer de mama tratadas con tamoxifeno en comparación con las pacientes no tratadas, especialmente las expuestas al tamoxifeno por largo plazo. Una etapa avanzada de la enfermedad se encuentra en la mayoría de las pacientes y el resultado suele ser mortal.²⁹

1.3.3.2 EFECTOS EN EL OVARIO

El tamoxifeno se sintetizó inicialmente como una sustancia anticonceptiva en la década de 1960, pero se encontró que inducía la ovulación en mujeres infértiles anovulatorias en 1971. En las mujeres premenopáusicas, la administración crónica de tamoxifeno puede causar un aumento de los estrógenos y la progesterona séricos, con sólo un ligero aumento de la hormona folículo estimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH).^{30, 31}

Las mujeres pre y postmenopáusicas tratadas con tamoxifeno tienen un mayor riesgo de desarrollar quistes ováricos. Este efecto se explica ya que el tamoxifeno actuaría estimulando las células de la granulosa de igual manera que en el endometrio, lo que contribuye al aumento de estrógenos, aumento que sólo ha quedado demostrado en pacientes premenopáusicas. Esta acción en las células de la granulosa contribuiría al desarrollo de esas formaciones o quistes funcionales en el ovario.³²

1.3.3.3 EFECTOS EN EL CÉRVIX

El tamoxifeno tiene un efecto estrogénico agonista en el cuello uterino de mujeres postmenopáusicas. Estudios han demostrado que las mujeres tratadas con tamoxifeno

tienen una mayor incidencia de atipia escamosa benigna o células escamosas atípicas de significado indeterminado, sin un aumento de la displasia o cáncer cervical. Esta incidencia aumenta un 55-70% en pacientes tratadas con tamoxifeno comparadas con un 28% de pacientes que reciben algún otro tratamiento.^{30, 33}

1.3.4 DIAGNÓSTICO DE LAS ENFERMEDADES EN EL OVARIO, EL ÚTERO Y EL CÉRVIX

Las alteraciones y enfermedades producidas en el ovario, el útero y el cérvix son diagnosticadas con diferentes métodos. Entre ellos:

- Útero: Laparoscopia, radiografía, tomografía, ultrasonido, biopsia.
- Cérvix: Papanicolaou, colposcopia, biopsia.
- Ovario: Ultrasonido pélvico, biopsia.

Sin embargo, estos métodos de diagnóstico no son tan específicos, ya que la mayoría no discriminan entre una patología y otra.³⁴ Es por eso que hay una necesidad de encontrar nuevos marcadores tempranos que permitan mejorar los métodos de diagnóstico y tratamiento en estas patologías y una alternativa lo constituyen los canales iónicos.

1.4 CANALES IÓNICOS

Los canales iónicos son proteínas de membrana que regulan los flujos masivos de iones a través de las células y participan en muchos y diversos eventos fisiológicos tales como la excitabilidad, la contracción, la progresión del ciclo celular y el metabolismo. Varios canales iónicos se han relacionado con la proliferación celular y el cáncer,

incluyendo canales de calcio, cloro y sodio, sin embargo, los canales de iones más comúnmente relacionados con la proliferación celular y el cáncer son los canales de potasio.³⁵

1.4.1 CANAL EAG

El canal éter à-go-go 1 (Eag1, KCNH1, Kv10.1) es miembro de la familia de los canales de potasio dependientes de voltaje Eag que también incluyen a los canales Erg y Elk. El canal de potasio éter à go-go fue clonado por primera vez de la *Drosophila melanogaster* y funcionalmente expresado en ovocitos de xenopus.^{36, 37}

Los miembros de la familia Eag1 comparten una estructura muy similar a la de otros canales de potasio dependientes de voltaje. Los canales Eag1 tienen cuatro α -subunidades idénticas, cada una contiene seis dominios transmembranales (S1-S6). Los extremos carboxilo y amino terminales están presentes en la región citoplasmática. La región del poro se encuentra entre S5 y S6 y es altamente selectiva para los iones de potasio, mientras que el dominio S4 actúa como un sensor de voltaje.^{26, 28}

El extremo N-terminal incluye un sitio de unión a la calmodulina (CaM) y un dominio PAS, que se ha asociado con otras proteínas en la detección de oxígeno y la activación del factor inducible por hipoxia (HIF1). El extremo C-terminal incluye un dominio de unión a los nucleótidos cíclicos (cNBD), un dominio de tetramerización, un dominio de localización nuclear (NLS) y los sitios de unión de calmodulina (CaM) y la cinasa dependiente de calcio-calmodulina II (CaMKII) como se muestra en la figura 6.^{36, 38}

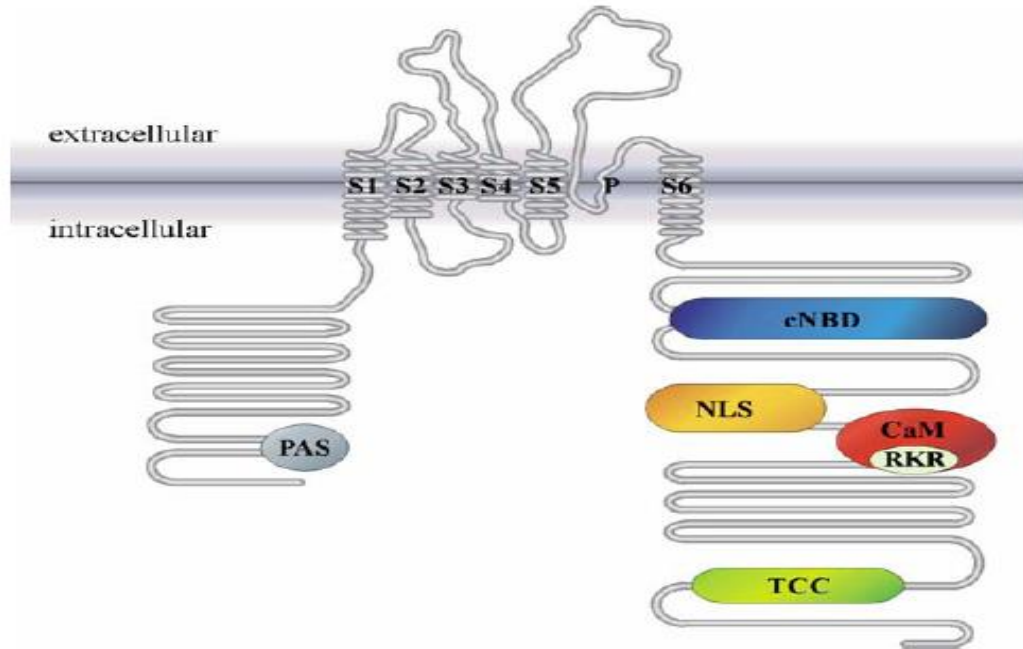


Figura 7. Estructura del canal Eag1. El canal Eag1 está formado por 4 subunidades alfa, cada una con 6 dominios transmembranales donde el carboxilo y amino terminal se encuentran en la región citoplasmática, los cuales además tienen dominios PAS, cNBD, CaM, NLS, CAMKII y TCC. Tomado de la Ref. 39.

Varios estudios han demostrado el potencial oncogénico de Eag1, ya que al transfectar el canal Eag1 en las células del ovario del hámster chino (CHO), mostraron un fenotipo transformado caracterizado por la capacidad de las células para crecer en una concentración baja de suero, aumentando la síntesis de ADN, una actividad metabólica más alta y la pérdida de inhibición por contacto.³⁷ Además, la implantación subcutánea de células CHO que expresan canales de Eag en ratones inmunodeprimidos (SCID) conduce a los tumores agresivos mostrando una necrosis intratumoral. El canal Eag1 también parece dar una ventaja selectiva para las células tumorales en la hipoxia por la producción del factor inducible de hipoxia-1 (HIF-1) y aumenta el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y la vascularización. Además, la expresión de los canales de Eag1 se ha demostrado que se asocia con la reorganización de la matriz extracelular y el citoesqueleto, por lo que puede influir con ello en la adhesión, la proliferación y la metástasis de las células tumorales.^{36, 37, 40}

Eag1 tiene una distribución restringida, se ha encontrado casi exclusivamente en cerebro, testículos, placenta y transitoriamente en mioblastos, de hecho, esta distribución restringida en los tejidos normales es una de las características más atractivas de Eag1 como un potencial marcador tumoral (Figura 7).⁴¹

Por el contrario, Eag1 se expresa abundantemente en las células tumorales, incluyendo el cuello uterino, el pulmón, la mama, el colon, y la próstata, por lo que se ha sugerido como un marcador del cáncer. Además, se ha observado una asociación de la amplificación de Eag1 con una reducción de la supervivencia global en los pacientes con carcinoma de colon.^{41, 42}

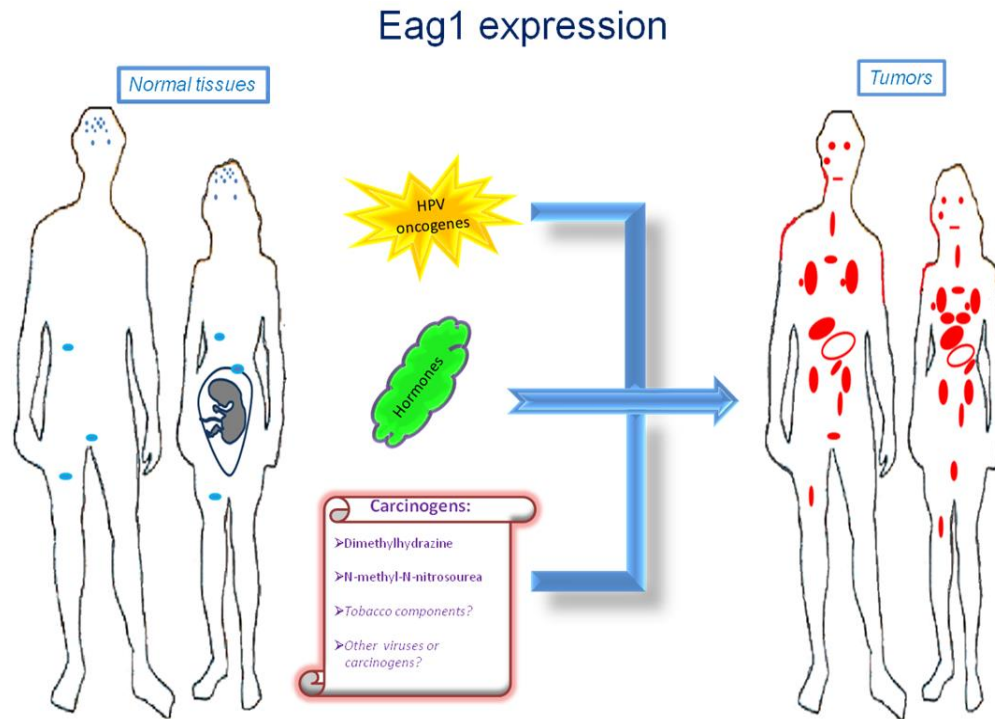


Figura 8. Expresión de Eag1 en el tejido normal y en los tumores. De manera normal Eag1 se expresa en cerebro, testículos, placenta y transitoriamente en mioblastos, mientras que se expresa abundantemente en las células tumorales incluyendo pulmón, mama, cuello uterino, colon y próstata. Tomado de la Ref. 38.

Por otra parte, la inhibición de la expresión de Eag1 disminuye la proliferación de las células tumorales, mientras que ha sido sugerida la inhibición de la actividad del canal por imipramina o astemizol para disminuir la proliferación de células cancerosas. Se ha observado que un bloqueo específico de Eag1 con anticuerpos monoclonales inhibe el

crecimiento de las células tumorales tanto *in vitro* como *in vivo*. Por lo tanto, Eag1 también se sugiere como un blanco terapéutico del cáncer.^{43,44}

1.4.1.1. Eag1 como marcador temprano

Un marcador temprano de cáncer debe detectar las lesiones premalignas o las condiciones que potencialmente pueden conducir al cáncer. Además, debe estar regulado por factores etiológicos del cáncer. En este sentido, el canal Eag1 es un buen candidato para funcionar como marcador temprano de varios tipos de cáncer.

En el caso de cáncer cervical, Eag1 ha sido detectado en biopsias cervicales de pacientes con Papanicolaou normales. Sin embargo, al hacer un análisis del expediente de las pacientes, una de ellas tenía infección con el virus del papiloma humano (VPH), que es el principal factor etiológico para el cáncer cervical. Otra paciente tenía un tumor benigno de ovario, y otra tenía hiperplasia endometrial. Este hallazgo sugiere que Eag1 puede ser un marcador temprano no solo de cáncer cervical, sino de alteraciones en tejidos cercanos como ovario y endometrio.⁴²

También se ha detectado la expresión de Eag1 en lesiones cervicales premalignas. Se encontró la expresión del canal en el 67 % de las citologías cervicales de las lesiones intraepiteliales de bajo grado y en el 92 % de las muestras de las lesiones intraepiteliales de alto grado, pero sólo en el 27% de las muestras normales. Además, las células morfológicamente normales obtenidas de las muestras displásicas también mostraron la expresión de Eag1. Esto es de suma importancia ya que en algunos casos, sólo las células morfológicamente normales son tomadas al realizar el Papanicolaou, por lo que se reporta el resultado como normal a pesar de la presencia de una lesión intraepitelial. En este sentido, la expresión de Eag1 podría servir como indicador para recomendar un seguimiento más estrecho del paciente.⁴⁵

Estudios *in vitro* demostraron que los oncogenes de VPH podrían regular la expresión de Eag1. Queratinocitos normales que carecen de oncogenes VPH no expresan

Eag1, sin embargo, los queratinocitos transfectados con los oncogenes E6 y E7 del VPH muestran una fuerte expresión de Eag1. La infección por VPH, se propone que sea necesaria, pero no suficiente para inducir el cáncer cervical, por lo que otros factores participan en su desarrollo, entre ellos los estrógenos. Se ha observado que la expresión del canal está regulada por los estrógenos. En la línea celular HeLa se demostró que los estrógenos eran capaces de inducir la expresión de Eag1, aunque esto parece depender específicamente de la presencia del RE α .⁴³

Esta misma regulación posiblemente también ocurra en las pacientes, ya que solo el 20 % de las pacientes que no consumen estrógenos como anticonceptivos orales muestran la expresión de Eag1 en citologías vaginales, mientras que el 50% de las pacientes que los consumen muestran expresión de este canal en la citología vaginal.⁴⁵

1.4.1.2 Regulación de Eag1 por el tamoxifeno

Interesantemente, un estudio realizado en la línea celular HeLa transfectada con el receptor de estrógenos α , mostró que el tamoxifeno por sí solo, o en conjunto con estrógenos era capaz de inducir la expresión del canal Eag1. Por lo que se puede pensar, que las alteraciones producidas por este fármaco podrían estar induciendo también la expresión de Eag1, lo cual podría sugerir el uso de este canal como marcador temprano y blanco terapéutico en tejidos como útero, cérvix y ovario, donde el tamoxifeno tiene efectos agonistas.⁴³

2 JUSTIFICACIÓN

El tamoxifeno es un fármaco ampliamente utilizado en la actualidad ya que ha demostrado tener resultados muy favorables en el tratamiento de cáncer de mama. Sin embargo, se ha probado que puede tener un efecto agonista o antagonista de los receptores a estrógeno dependiendo del tejido. En el ovario, el útero y el cérvix se ha reportado un efecto agonista provocando alteraciones en estos tejidos. Encontrar un marcador temprano que permita detectar estas alteraciones ayudaría a tener métodos de diagnóstico más sensibles que permitan una detección y tratamiento oportunos.

3 HIPÓTESIS

La expresión de Eag1 es mayor en el útero, el cérvix y el ovario de ratones tratados con tamoxifeno en comparación con los ratones control y se asocia con la expresión de los receptores a estrógeno.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la expresión del canal Eag1 en diferentes tejidos (útero, ovario y cérvix) de ratones tratados con tamoxifeno.

4.2 OBJETIVOS PARTICULARES

Determinar por medio de PCR en tiempo real la expresión de Eag1 y los receptores a estrógenos α y β en el tejido de cérvix, ovario y útero de ratones hembra Balb/c tratados con tamoxifeno y sin él.

Determinar la expresión de Eag1 por medio de inmunohistoquímica en el ovario, el útero y el cérvix de ratones control y tratados con tamoxifeno.

Correlacionar la expresión de Eag1 con la de los receptores a estrógenos.

5 MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 ANIMALES

Se utilizaron ratones hembra Balb/cJ de 6 a 8 semanas obtenidos de la Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio del Cinvestav (UPEAL-Cinvestav) con el protocolo 0050-13 aprobado por el Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio del Cinvestav (CICUAL, Cinvestav).

Los animales se mantuvieron dentro de la Unidad de experimentación 3 del UPEAL-Cinvestav bajo las normas y cuidados que establece la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999.⁴⁶ La comida (Labdiet® Formulab Diet) y agua se les dio *ad libitum* durante todo el tratamiento. Y se mantuvieron a una temperatura en el cuarto del bioterio de 21°C +-1 y una humedad del 50%.

5.2 TRATAMIENTO

Se formaron 2 grupos:

- Grupo control: 20 ratones hembra Balb/cJ de 6 a 8 semanas sanos, sin tratamiento
- Grupo experimental: 20 ratones hembra Balb/cJ de 6 a 8 semanas a los cuales se les colocó un comprimido subcutáneo de tamoxifeno 0.05 mg (Tamoxifen Free Base, NE-361, Innovate Research of America) que libera el fármaco durante 90 días.

5.3 MUESTREO

Se realizaron citologías vaginales cada 10 días para conocer la fase del ciclo estral, el procedimiento consistió en sujetar el ratón hembra con la mano izquierda y ponerlo en posición boca abajo, con ayuda de una pipeta con punta estéril se tomaron aproximadamente 10 microlitros de PBS estéril y se introdujeron en la vagina de ratón con cuidado y apenas tocando con la punta. Con la misma punta se retiró el líquido y se colocó en una laminilla cargada, dejando secar y posteriormente fijando con alcohol al 96%. Las laminillas se dejaron en refrigeración 1 día hasta la realización de la inmunocitoquímica.

5.4 SACRIFICIO

Después de los 90 días de tratamiento, los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical, se extrajeron el ovario, el útero, el cérvix, el hígado, el cerebro y el cerebelo.

5.5 PCR EN TIEMPO REAL

El útero y el cérvix fueron colocados en tubos eppendorff etiquetados para cada órgano, los cuales contenían 400 µl de RNA later® (AM7021, Ambion) y posteriormente se depositaron en un contenedor con nitrógeno líquido para mantener los tejidos congelados y evitar su degradación. Los ovarios fueron colocados en un tubo eppendorff con 200 µl de RNA later® y se depositaron en un contenedor con nitrógeno líquido.

El hígado, el cerebro y el cerebelo fueron colocados en tubos eppendorff con 1 ml de Trizol® (TRI Reagent®, SIGMA, T9424-200ML) y guardados en un contenedor con nitrógeno líquido. Las muestras se mantuvieron en congelación a -70 °C hasta su posterior procesamiento.

5.5.1 HOMOGENEIZADO DE MUESTRAS

Se descongelaron los tubos eppendorff que contenían los órganos y fueron homogeneizados en un mortero con nitrógeno líquido para mantenerlos fríos y evitar su degradación. Una vez que los órganos se homogeneizaron, se tomó aproximadamente 0.1 g del homogeneizado y se colocó en un tubo eppendorff con 1 ml de trizol®. Se agitó hasta que se disolvió por completo y se colocó en un contenedor con nitrógeno líquido.

5.5.2 EXTRACCIÓN DE RNA

Los tubos con el homogeneizado disuelto en Trizol® se dejaron descongelar a temperatura ambiente, a cada uno se le adicionaron 200 µl de cloroformo (Chloroform, Sigma Aldrich, C2432-500ML) y se agitaron de forma manual.

Se centrifugaron a 4 °C por 30 min a 12500 rpm, posteriormente se tomó la fase acuosa (400µl) y se colocó en un tubo eppendorff que contenía 500 µl de isopropanol (2-Propanol, Sigma Aldrich, T9516-500ML).

Se centrifugaron nuevamente a 4 °C por 30 min a 12500 rpm, el isopropanol se decantó y se adicionó 1 ml de etanol al 70% (Ethanol, Sigma Aldrich, E7148-500ML). Se centrifugaron a 4°C por 30 min a 12500 rpm, el etanol se decantó y el precipitado se resuspendió con agua estéril. Los tubos con RNA se mantuvieron a -70°C hasta su posterior procesamiento.

5.5.3 LECTURA DE RNA

Para conocer la concentración de RNA, se tomó 1 µl de RNA de cada muestra y se colocó en el nanodrop (NanoDrop Lite Spectrophotometer, Thermo Scientific) utilizando agua estéril como blanco. El resultado que se obtuvo fue en ng/µl. Las mediciones se

realizaron por duplicado siempre y cuando el coeficiente de variación (C.V.) entre cada medición fuera menor al 3%, en caso contrario se realizaron mediciones por triplicado.

5.5.4 TRATAMIENTO CON DNasa

Se colocó en tubos especiales 5 µg de RNA, 1 µL de DNasa (DNase 1 recombinant RNasa-free, 04716728001, Roche) preparada a una dilución 1:1 con agua estéril y c.b.p de agua estéril.

Los tubos se colocaron en el termociclador (Thermal Cycle 2720, Applied Biosystem) por 60 min a 37 °C.

5.5.5 SÍNTESIS DE cDNA

Se preparó la solución 1, la cual contenía para cada tubo de reacción:

- 0.5 µl de OligodT a una concentración de 1 µg/µL (Sigma Aldrich)
- 1µl dNTP a una concentración de 10 mM (Deoxynucleotide Solution Set, New England BioLab N04465)
- 0.5 µL de agua estéril

Se agregó la solución 1 al tubo de reacción, se agitaron en vórtex y se colocaron en el termociclador a 65°C por 5 min.

Posteriormente, se agregó la solución 2 a cada tubo de reacción, la cual contenía para cada tubo de reacción:

- 2.5 µl de Buffer M-MuLV 10x (Reverse Transcriptase Reaction Buffer, New England BioLabs M0253S)

- 1.0 μ l de RNase-OUT a una concentración de 40U/mL (RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor, Invitrogen Life Technologies, 10777-019)
- 0.3 μ l de MMULV a una concentración de 200000 U/mL (M-MuLV Reverse Transcriptase, New England Bio Labs, M0253S)
- Agua estéril 3.5 μ l

Se adicionó la solución 2 (7.3 μ l) a cada tubo de reacción, se agitaron y colocaron en el termociclador con las siguientes especificaciones:

- 37°C por 60 min
- 70°C por 15 min
- 4°C por 60 min

Una vez concluido este tiempo, los tubos con cDNA se guardaron en congelación (-20°C) hasta su posterior procesamiento.

5.5.6 PCR EN TIEMPO REAL

Se realizó el ensayo de PCR en tiempo real para cada muestra por duplicado. En cada pozo de la placa se colocaron 6.25 μ l de Master mix (TaqMan® Universal PCR Master Mix, Applied Biosystem, 4304437), 1 μ l de cDNA, 0.625 μ l de sonda y c.b.p de agua estéril para un volumen final de reacción de 12 μ l.

Las sondas utilizadas fueron:

- RE α (Mm00433149_m1 Esr1, TaqMan® Gene Expression Assays, Applied Biosystem)
- RE β (Mm00599821_m1 Esr2, TaqMan® Gene Expression Assays, Applied Biosystem)
- Ciclofilina (Mm03302254_g1 Ppia, TaqMan® Gene Expression Assays, Applied Biosystem)

- ☞ HPRT (Mm01545399_m1, TaqMan® Gene Expression Assays, Applied Biosystem)
- ☞ GAPDH (Mm99999915_g1, TaqMan® Gene Expression Assays, Applied Biosystem)
- ☞ Eag1 (Mm01316869_m1 KCNH1, TaqMan® Gene Expression Assays, Applied Biosystem)
- ☞ Glucoronidasa β (Mm01197698_m1 Gusb, TaqMan® Gene Expression Assays, Applied Biosystem)

Una vez que los pozos contenían los reactivos necesarios, se cubrió la placa con un adhesivo y se agitó en vórtex por 20 seg, aproximadamente. Se colocó la placa en una centrífuga manual de tal manera que todos los reactivos quedaran en la parte del fondo de la placa.

La placa se colocó en el equipo StepOnePlus Real-Time PCR System de Applied Biosystems, con las siguientes condiciones de reacción:

- ☞ Holding: 95°C 10 min
- ☞ 40 ciclos: 95°C 15 min, y 60°C por 1 min

Al finalizar el tiempo de reacción se ajustó el threshold manualmente y se obtuvieron los promedios de Ct para cada muestra.

Para realizar el cálculo de expresión relativa se utilizó el método de doble delta ($\Delta\Delta CT$). Los experimentos de CT comparativos determinan el cambio de expresión de un gen en una muestra en relación con el mismo gen en una muestra de referencia.

Se realizó una prueba con 5 endógenos (Ciclofilina, HPRT, GAPDH, B2-Microglobulina y Glucoronidasa β), para determinar el gen endógeno más adecuado. De estos, el gen que se escogió como gen endógeno para todos los órganos fue Glucoronidasa β .

Con los resultados de Ct de este gen para cada muestra se calculó la primer delta (ΔCt) utilizando la siguiente fórmula:

$$\Delta Ct = Ct \text{ gen problema} - Ct \text{ del gen endógeno}$$

La segunda delta ($\Delta\Delta Ct$) fue calculada con la siguiente fórmula:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ muestra problema} - \Delta Ct \text{ muestra control}$$

Finalmente la expresión relativa se calculó utilizando la fórmula:

$$\text{Expresión relativa} = 2^{(-\Delta\Delta Ct)}$$

5.6 INMUNOHISTOQUÍMICA

Los tejidos extraídos (ovario, útero, cérvix, cerebro, cerebelo, hígado) se lavaron en una solución de Hanks (Hanks Balanced Solution GIBCO BRL, Life Technologies, 0560) y se colocaron en un tubo con formol al 10% (DROTASA).

Los tejidos se conservaron en refrigeración por 12 horas aproximadamente.

5.6.1 INCLUSIÓN EN PARAFINA

Después de las 12 horas en formol al 10% (DROTASA), los órganos se colocaron en un casset con tapa especial para la inclusión en parafina y pasaron por una serie de soluciones para deshidratar el tejido:

Etanol 30% 50 min, etanol al 50% 45 min, etanol 60% 45 min, etanol 70% 45 min, etanol 80% 45 min, etanol 90% 45 min, etanol 96% 45 min, alcohol absoluto 1 por 1 hora, alcohol absoluto 2 por 12 horas (Baker Analyzed®), xilol 1 por 1 hora, xilol 2 por 1 hora

(HerschI Trading x1010), parafina a 65°C por 1 hora, parafina 2 por 1 hora (Sigma Aldrich).

Para realizar la inclusión se enceraron moldes especiales para la inclusión, se colocó una capa de parafina derretida, y posteriormente se colocó el órgano en la posición deseada y se cubrió con parafina. Finalmente, se colocó el casset para fijar el tejido a este. Se dejaron enfriar a temperatura ambiente por 12 horas.

5.6.2 CORTES DE TEJIDO

Una vez embebidos en parafina, los tejidos fueron cortados con ayuda de un microtomo (Leica) en donde se obtuvieron cortes de 3 µm aproximadamente y se colocaron en laminillas cargadas, las cuales se mantuvieron en refrigeración hasta la realización de la inmunohistoquímica.

5.6.3 INMUNOHISTOQUÍMICA

Los cortes de 3 µm en parafina de los diferentes tejidos a probar se colocaron en laminillas cargadas, se desparafinizaron en un horno a 67°C hasta que se derritió toda la parafina del tejido.

Posteriormente, se rehidrataron sumergiéndolas de 3 a 5 veces en baños sucesivos de Xilol, xilol/alcohol absoluto (1:1), alcohol absoluto, alcohol 96%, alcohol 70% y agua.

Se realizó la recuperación antigénica inducida por el calor, colocando las laminillas en una solución de buffer de citrato (Immuno DNA Retriever Citrate, BSB 0020, BioSB) y se colocaron en una olla de presión a máxima temperatura durante 15min aproximadamente, posteriormente se dejaron enfriar a temperatura ambiente, se retiró la solución de citrato y se colocaron en el buffer de lavado. Se montaron en una gradilla para

inmunohistoquímica y se enjuagaron con buffer de lavado (Immuno/DNA Washer BSB 0042, BioSB)

Se agregaron 100 µl del bloqueador dual de la actividad endógena de la peroxidasa (Mouse/Rabbit Immunodetector Peroxidase Blocker, BSB005, BioSb) y se incubaron durante 10 min.

Se enjuagaron con buffer de lavado y se agregaron 100 µl del bloqueador de proteína (Immunodetector Protein Blocker/Antibody diluent, BSB 0041, BioSB) por 10 min.

Se enjuagaron con buffer de lavado y posteriormente se agregaron 100 µl del anticuerpo Eag1 1:500 (pAb anti-KCNH1 Antibody, NBPI-42816, Novus Biologicals) y se dejó incubar durante 60 min.

Se enjuagó con buffer de lavado y se agregaron 100 µl del anticuerpo secundario anti-conejo por 45 min.

Se enjuagó con buffer de lavado y se desmontaron de la gradilla. Se revelaron con una solución de DAB preparado como: DAB 1 gota (Immunodetector DAB Chromogen BSB 0005, BioSB) en 1 ml de buffer (Mouse/Rabbit Immunodetector DAB Buffer/Substrate, BSB 0005, BioSB). Se agregaron 100 µL de esta solución por 25 segundos aproximadamente.

Se enjuagaron con agua y se contrastaron los tejidos con hematoxilina (Hematoxilina de Harris, SEALAB, C16H1406) durante 40 seg aproximadamente. Se enjuagaron y se sumergieron en hidróxido de amonio 0.05% y después en agua.

Posteriormente, las laminillas se sumergieron 2-3 veces de forma regresiva en los baños (etanol 70%, etanol 96%, alcohol absoluto, xilol/alcohol absoluto (1:1), xilol). Se montaron con resina permanente para microscopía (Microscopy Entellan®, MERCK, 1.07961.0500) y se visualizaron con un microscopio de luz para su evaluación. Una coloración café indica la expresión de la proteína.

6 RESULTADOS

6.1 CITOLOGÍAS VAGINALES

Para determinar la etapa del ciclo estral en la que se encontraban los ratones, se realizaron citologías vaginales cada 10 días a los 40 ratones hembra. En la figura 9 se observan los 3 tipos de células encontradas en los frotis vaginales y con las cuales se identifica la etapa del ciclo estral.

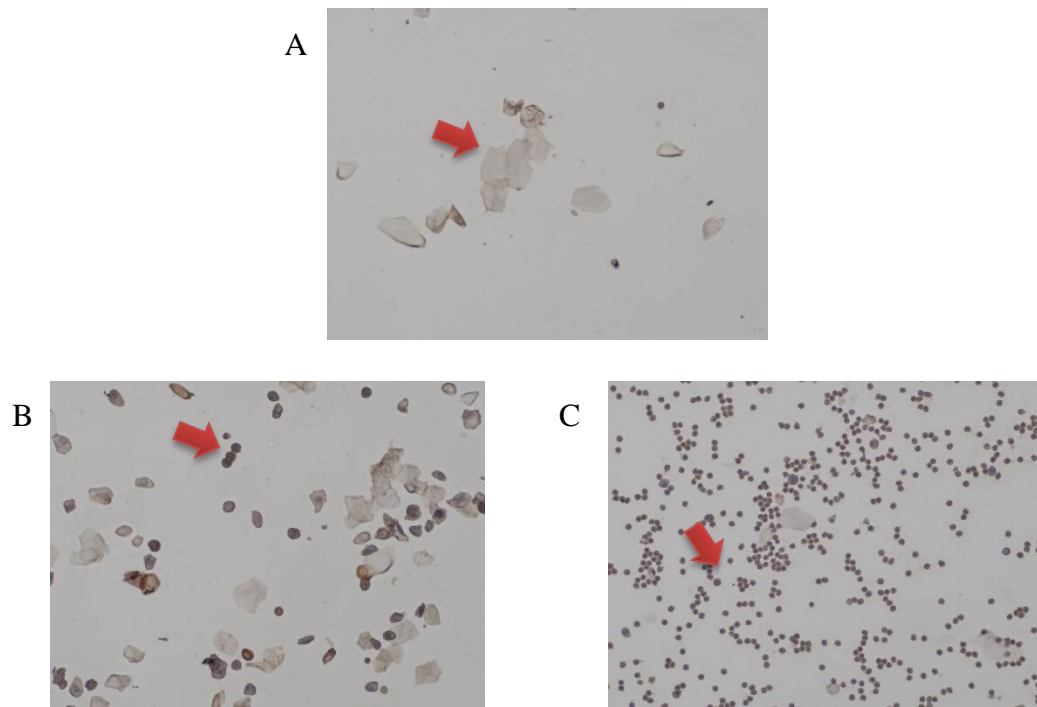


Figura 9. Inmunohistoquímicas de las citologías vaginales. A) Células queratinizadas, B) Células nucleadas, C) Leucocitos.

Como se observa en la figura 10, en las ratonas control se pueden observar las 4 etapas del ciclo estral durante los 90 días, mientras que en las ratonas tratadas con tamoxifeno (figura 11) la etapa de estro se pierde completamente, lo cual indica que el tamoxifeno tiene efecto al unirse a los receptores, bloqueando la unión de los estrógenos. La etapa de estro, como su nombre lo indica se presenta cuando se da un pico en la concentración de estrógenos.

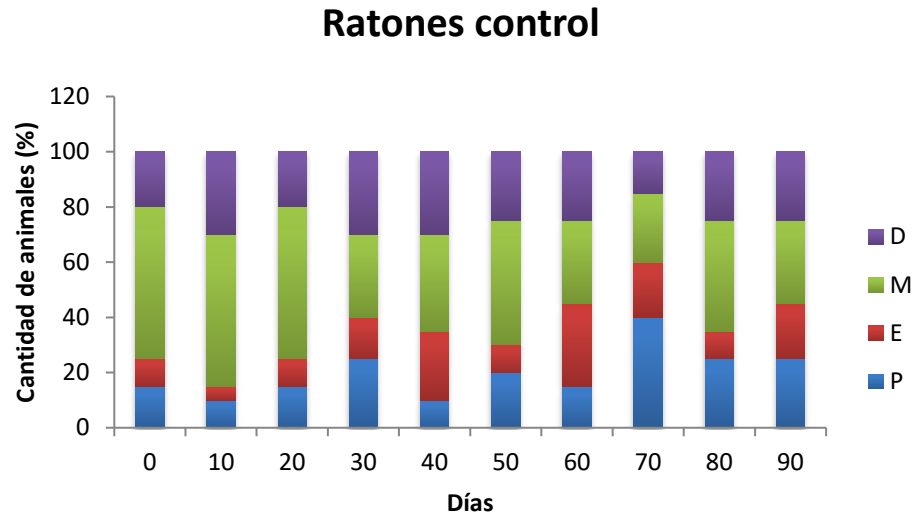


Figura 10. Porcentaje de ratones hembra Balb/cJ control en las diferentes etapas del ciclo estral. D.diestro, M, metaestro. E, estro. P, proestro.

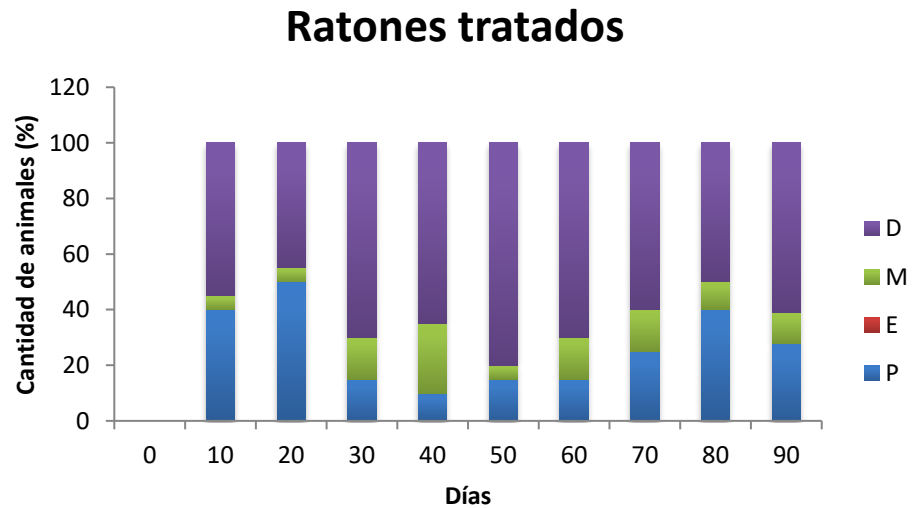


Figura 11. Porcentaje de los ratones hembra Balb/Cj tratados con tamoxifeno en las diferentes etapas del ciclo estral. D.diestro. M, metaestro. E, estro. P, proestro.

6.2 FOTOGRAFÍAS DE LOS ÓRGANOS EXTRAIDOS

Como puede observarse en la figura 12 no se ven a simple vista daños o alteraciones aparentes en el ovario, el útero y el cérvix de los ratones hembra, además de que no hay una diferencia aparente entre los órganos de los ratones tratados y los ratones control.

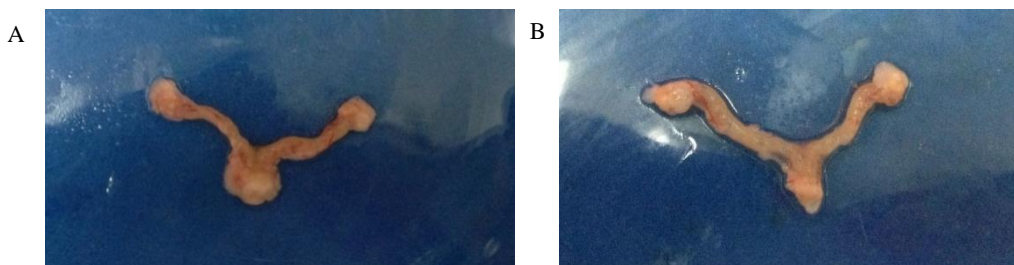


Figura 12. Ovario, útero y cérvix extraídos de los ratones hembra Balb/cJ. A) Control, B) Tratados con tamoxifeno 0.05 mg/comprimido por 90 días.

En la figura 13 y 14 se observan los órganos utilizados como control positivo (cerebro y cerebelo) y negativo (Hígado) para PCR en tiempo real e inmunohistoquímica de la expresión de Eag1, los cuales no muestran alteraciones o diferencias entre los dos grupos.

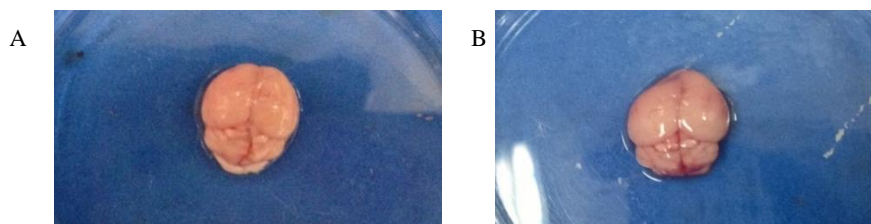


Figura 13. Cerebro y cerebelo de los ratones Balb/cJ, A) Control, B) Tratados con tamoxifeno 0.05 mg/comprimido por 90 días.

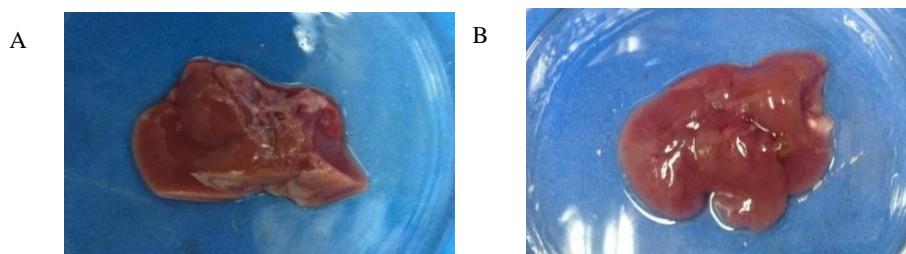


Figura 14. Hígado de los ratones hembra Balb/cJ, A) Control, B) Tratados con tamoxifeno 0.05 mg/comprimido por 90 días.

6.3 CÉRVIX

6.3.1 PCR

Se realizó una prueba estadística de t de student, sin embargo, no se encontró diferencia significativa en la expresión de *Eag1*, y los receptores a estrógenos alfa y beta entre los dos grupos (Figura 15). Sin embargo, se observa una aparente disminución de *Eag1* y un aumento del receptor a estrógenos beta. Una de las razones por las cuales puede no haber diferencia estadística es la variabilidad biológica de los animales, que se refleja en una desviación muy grande.

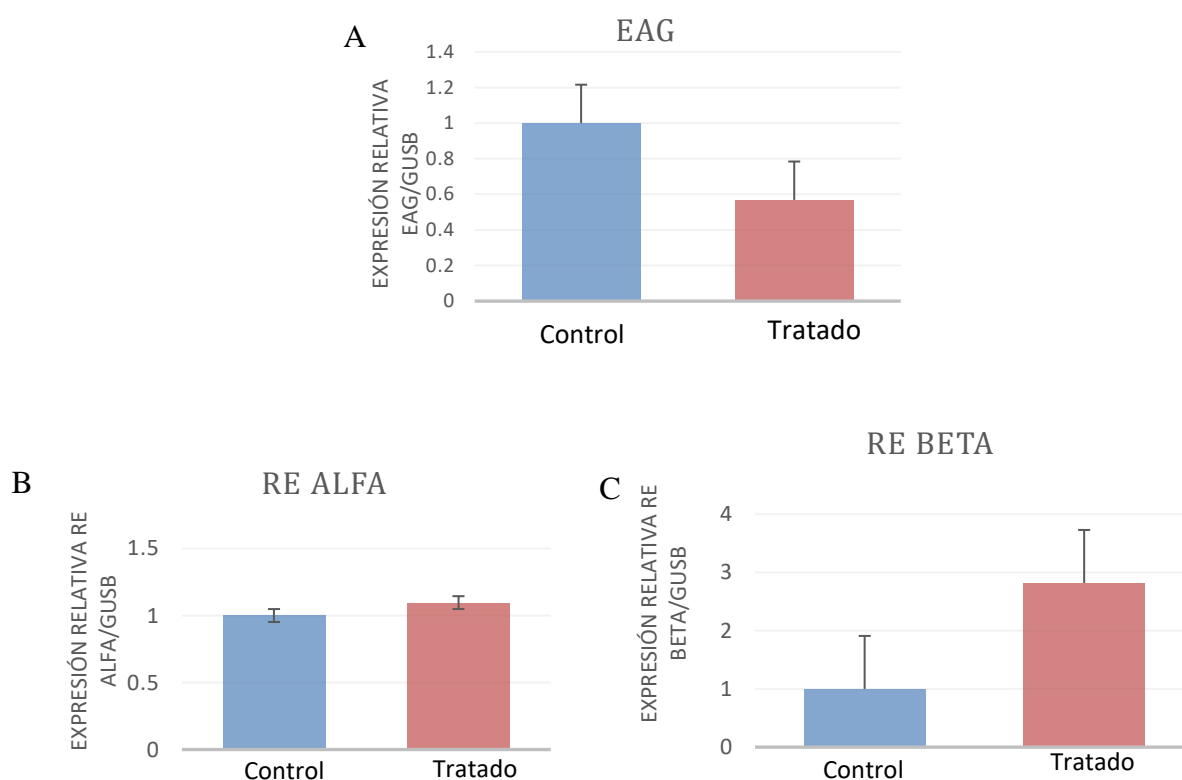


Figura 15. Expresión relativa en el cérvix de ratones control y tratados con tamoxifeno. A) *Eag1*, B) *RE α* , C) *RE β* .

6.3.2 Inmunohistoquímica

En la figura 16 se muestra como control positivo el cerebelo en donde se puede observar la marca café que corresponde a la expresión de Eag1. Además, se muestran los controles negativos de tejido y sin anticuerpo primario, confirmando que el anticuerpo utilizado funciona adecuadamente.

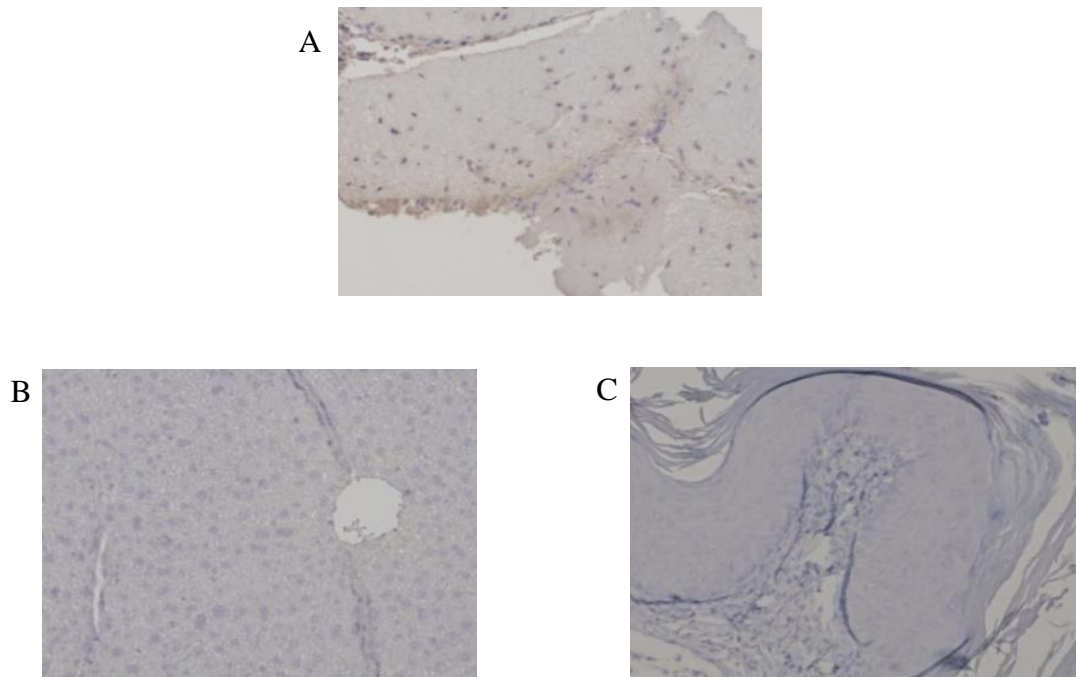


Figura 16. Inmunohistoquímicas de los tejidos de los ratones hembra Balb/cJ. A) Control positivo de la expresión de Eag1 en cerebelo. B) Control negativo de tejido en hígado. C) Cérvix sin anticuerpo primario usado como control negativo. La marca café indica la expresión de Eag1.

La expresión de *Eag1* a nivel de proteína parece ser mayor en el cérvix de ratones control comparado con los ratones tratados con tamoxifeno tanto en endocérvix como en exocérvix, corroborando la tendencia observada a nivel de mensajero. Además, como se observa en la figura 17, la expresión de *Eag1* es mayor en el epitelio tanto de exocérvix como de endocérvix que en el estroma.

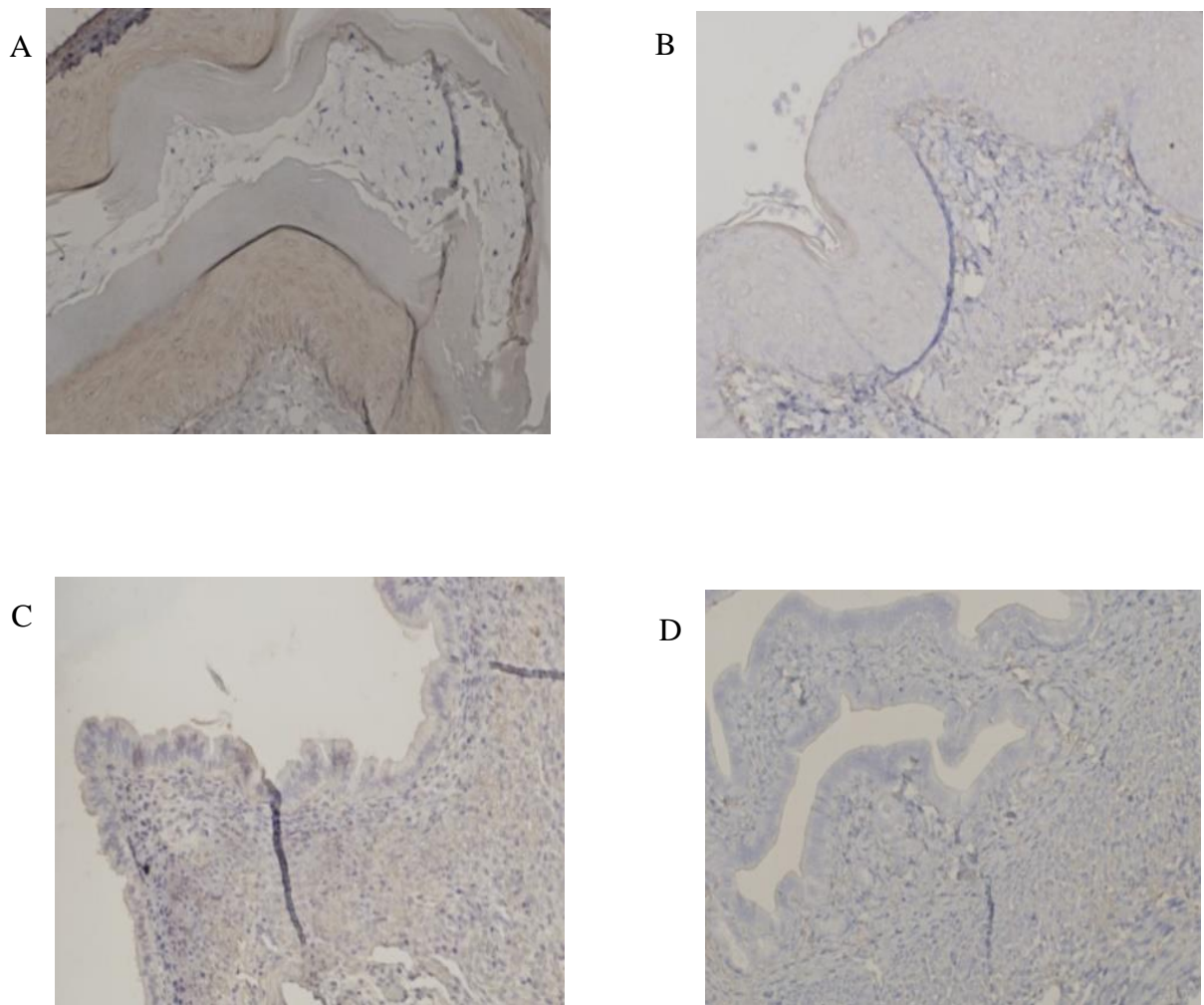


Figura 17. Expresión de Eag1 a nivel de proteína. A) Exocérvix de ratón control, B) Exocérvix de ratón tratado con tamoxifeno. C) Endocérvix de ratón control. D) Endocérvix de ratón tratado con tamoxifeno. La marca café indica la expresión de Eag1.

6.4 ÚTERO

6.4.1 PCR

Al igual que en los resultados en cérvix, al realizar el análisis estadístico no se observó una diferencia significativa en la expresión de *Eag1* o los receptores a estrógeno alfa y beta. Sin embargo, nuevamente hay una tendencia de la disminución de la expresión a nivel de RNAm de *Eag1* y un aumento del receptor a estrógenos beta (Figura 18).

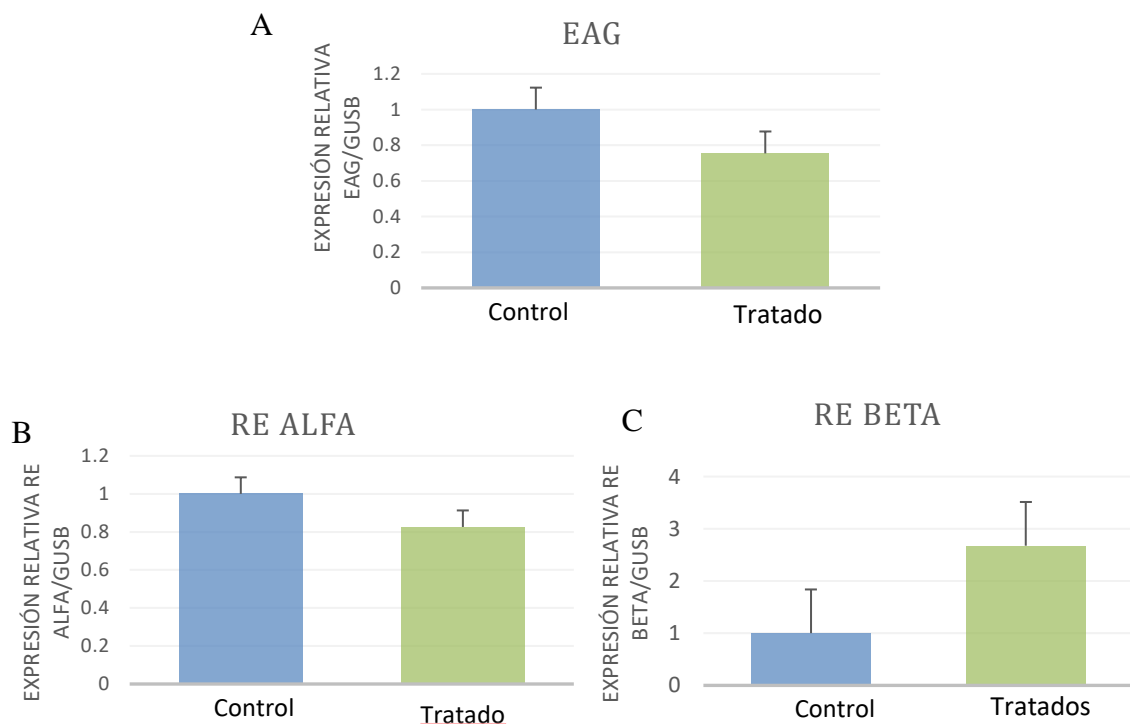


Figura 18. Expresión relativa en útero de ratones hembra *Balb/cJ* controles y tratados con tamoxifeno. A) *Eag1*, B) $RE\alpha$, C) $RE\beta$.

6.4.2 Inmunohistoquímica

En la figura 19 se muestran los controles positivos y negativos. La marca café corresponde a la expresión de Eag1.

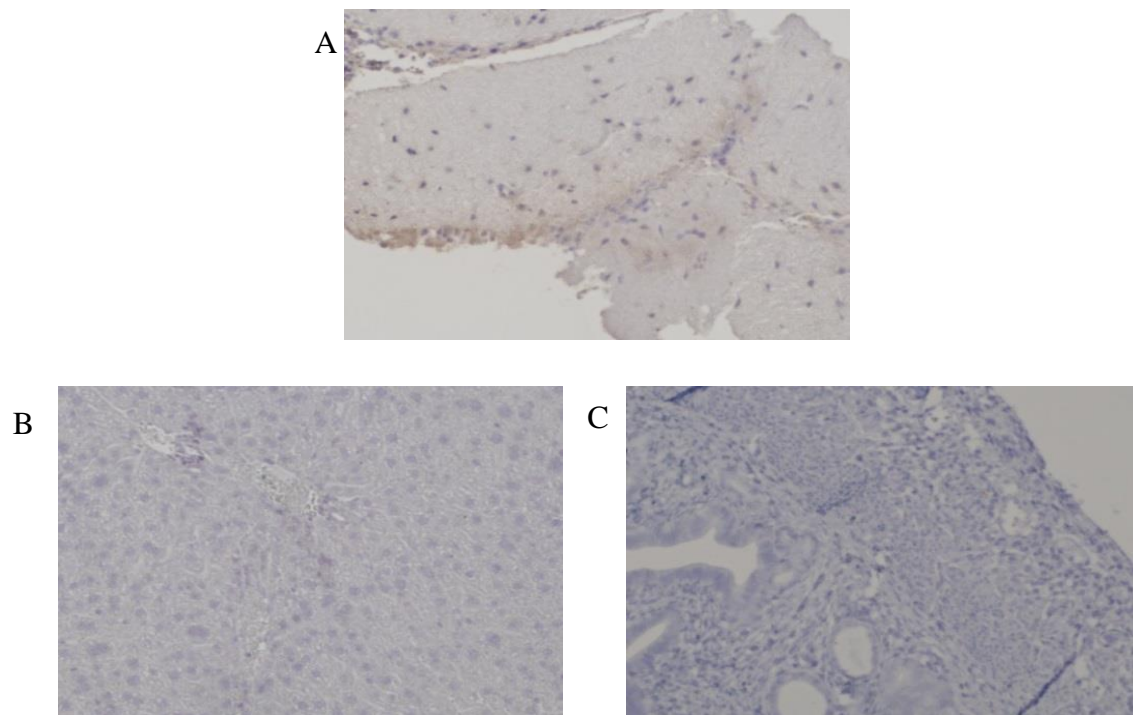


Figura 19. Inmunohistoquímica de los tejidos de ratones hembra Balb/cJ. A) Control positivo de la expresión de Eag1 en cerebelo. B) Control negativo de la expresión de Eag1 en hígado. C) Útero sin anticuerpo primario utilizado como control negativo. La marca café indica la expresión de Eag1.

Las inmunohistoquímicas realizadas muestran una mayor expresión a nivel de proteína de Eag1 en el útero de ratones controles en comparación con los ratones a los cuales se les administró tamoxifeno por 90 días (Figura 20, 21).

Estos resultados son similares a los encontrados en el cérvix y corroboran la tendencia mostrada por los experimentos de PCR en tiempo real.

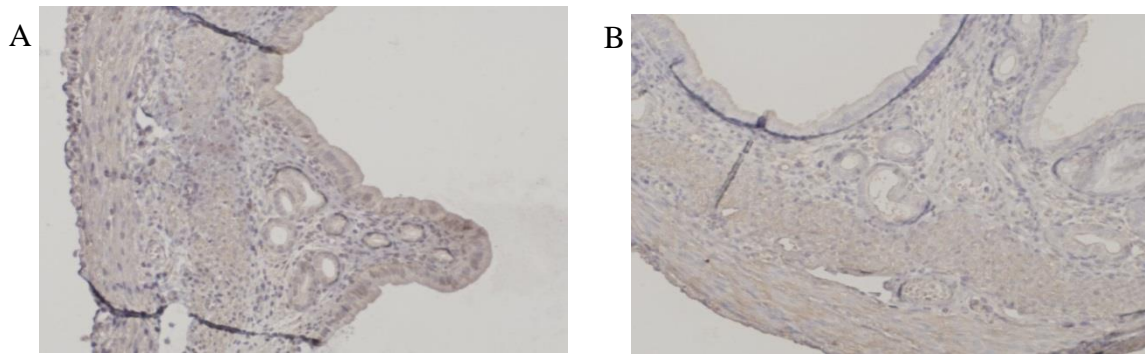


Figura 20. Expresión a nivel de proteína de Eag1 en el útero de los ratones hembra Balb/cJ control. La marca café indica la expresión de Eag1

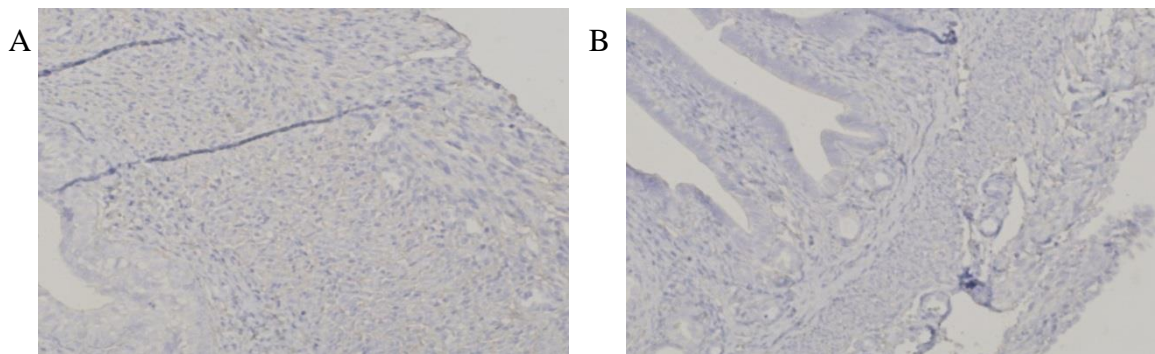


Figura 21. Expresión a nivel de proteína de Eag1 en el útero de ratones hembra Balb/cJ tratados con tamoxifeno (0.05mg/comprimido) por 90 días. La marca café indica la expresión de Eag1.

6.5 OVARIO

6.5.1 PCR

Los resultados mostrados en las figura 22 muestran que no hay una diferencia significativa en la expresión a nivel de RNAm de *Eag1* y los receptores a estrógenos alfa y beta. Incluso no se observan las mismas tendencias de aumento y disminución de *Eag1* y $RE\beta$, respectivamente como se mostraba en el útero y el cérvix.

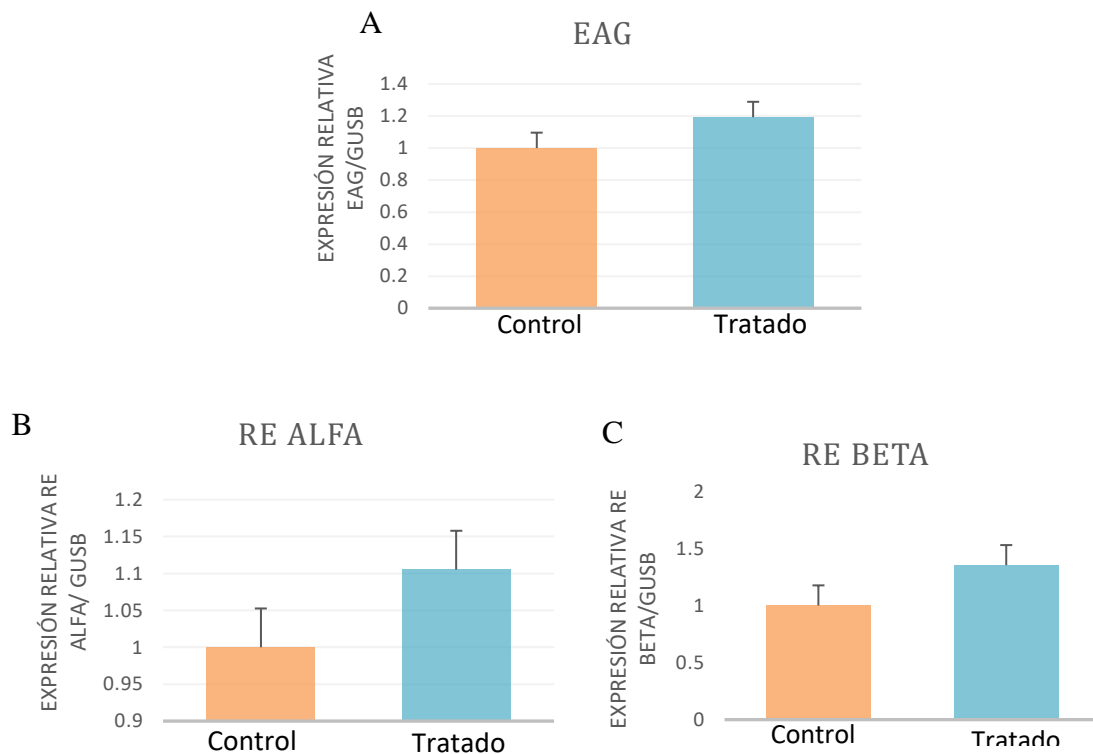


Figura 22. Expresión relativa en el ovario de los ratones hembra Balb/cJ controles y tratados con tamoxifeno. A) *Eag1*, B) $RE\alpha$, C) $RE\beta$.

6.5.2 Inmunohistoquímica

Nuevamente se muestran en la figura 23 los controles negativos y positivos de la inmunohistoquímica en ovario, los cuales comprueban que la marca café observada corresponde la expresión de la proteína Eag1.

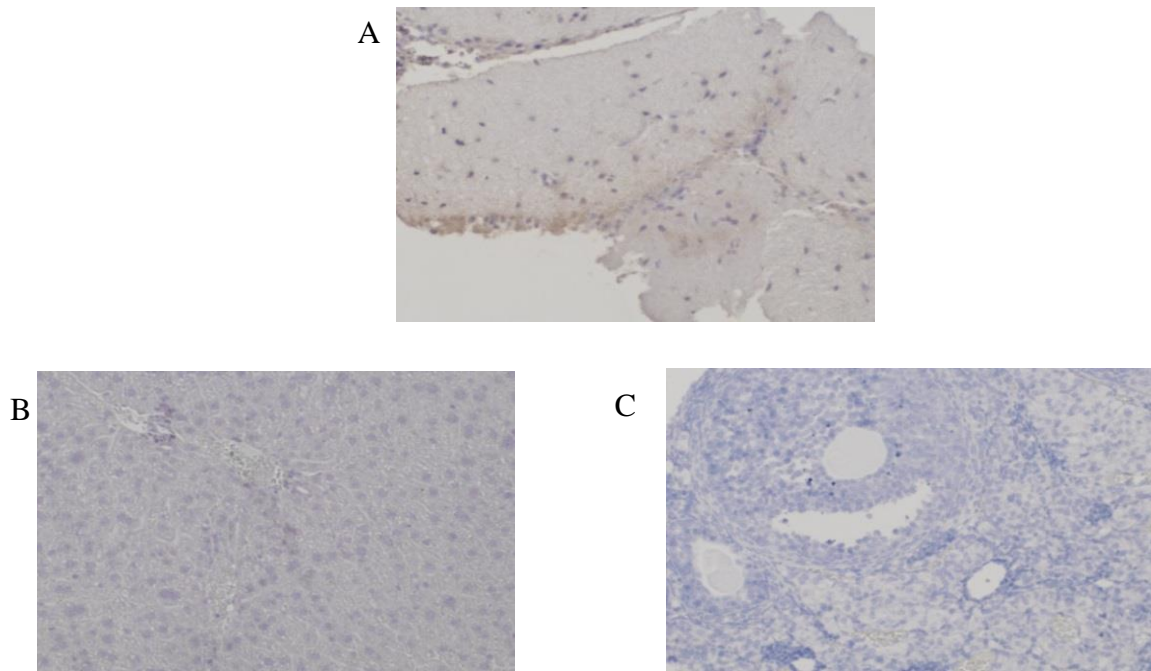


Figura 23. Inmunohistoquímicas en los tejidos de ratón hembra Balb/cJ. A) Control positivo de la expresión de Eag1 en cerebelo. B) Control negativo de la expresión de Eag1 en hígado. C) Ovario sin anticuerpo primario usado como control negativo. La marca café corresponde la expresión de Eag1.

La expresión a nivel de proteína de *Eag1* no muestra diferencias entre los ratones control y tratados en el ovario (Figura 24, 25), al igual que se observó en los resultados de PCR tiempo real. Lo cual indica que el tratamiento con tamoxifeno no cambió la expresión de este canal por lo menos con este tiempo de tratamiento y en este tejido en particular.

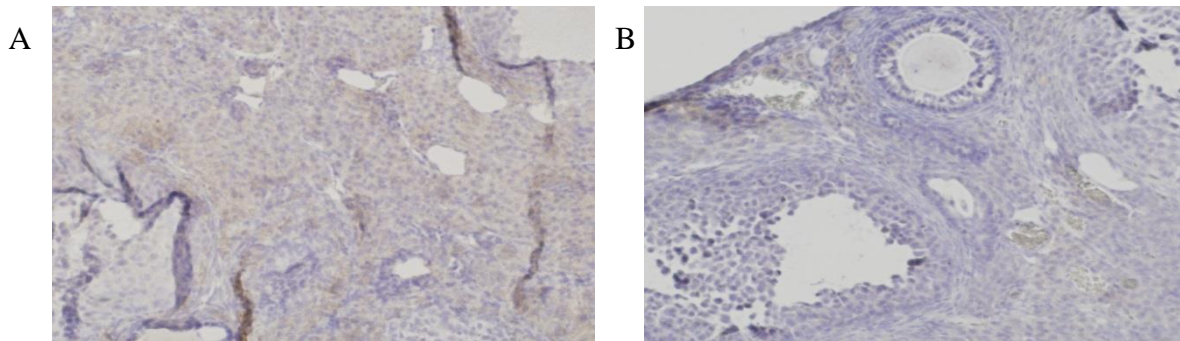


Figura 24. Expresión a nivel de proteína de *Eag1* en el ovario de los ratones hembra Balb/cJ controles. La marca café corresponde a la expresión de *Eag1*.

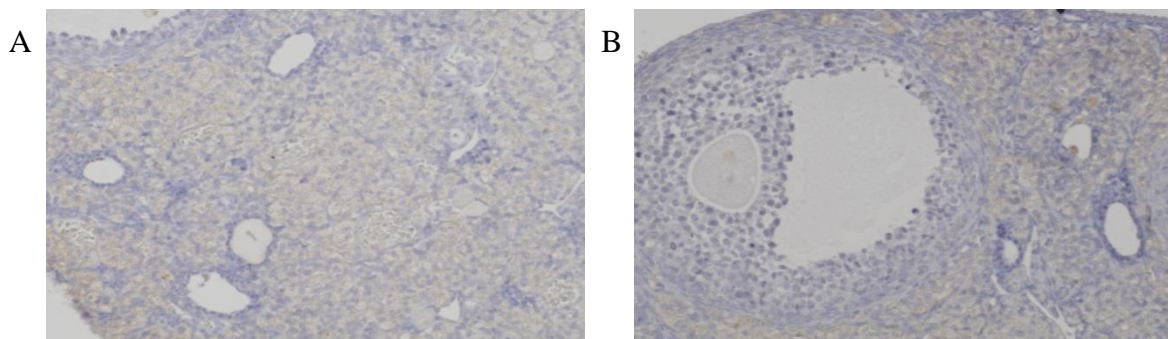


Figura 25. Expresión a nivel de proteína de *Eag1* en el ovario de los ratones hembra Balb/cJ tratados con tamoxifeno. La marca café indica la expresión de *Eag1*.

7 DISCUSIÓN

El tamoxifeno es un fármaco de primera elección para el tratamiento de cáncer de mama en aquellas pacientes que resultan positivas a los receptores a estrógenos, ha demostrado que reduce el riesgo de recaída en más del 50% y genera una disminución de la mortalidad superior al 20%, mientras que la reducción del riesgo de cáncer de mama contralateral es del 30%.¹⁹

Sin embargo, se ha demostrado que el tamoxifeno se comporta en el endometrio como un agonista parcial del RE. Induce así un aumento del grosor de la mucosa, a veces la aparición de pólipos y, sobre todo aumenta el riesgo de cáncer endometrial de 2-7 veces. Incluso se han reportado efectos adversos en el cérvix y el ovario.^{29,30}

Los efectos del tamoxifeno en cada tejido dependen de varios factores, entre ellos están la concentración de receptores, la distribución de los receptores a estrógeno alfa y beta, que como se sabe es diferente en los diferentes tejidos, la presencia de coactivadores y correpresores y la modulación de factores de crecimiento y otros factores.¹

El efecto antagonista del tamoxifeno es citostático, bloqueando el inicio de la fase G1 del ciclo celular en las células tumorales. El tamoxifeno bloquea la actividad del dominio de activación del receptor AF-2, por consiguiente, se manifestará como un antagonista de los estrógenos en todos los ambientes celulares sobre genes que requieran sólo al AF-2; no obstante, en los ambientes donde el AF-1 sea el activador dominante, el tamoxifeno manifestará su habilidad como agonista parcial.³

En este trabajo se utilizaron ratones hembra Balb/cJ a los cuales se les administró tamoxifeno por vía subcutánea por un periodo de 90 días.

Las citologías vaginales realizadas cada 10 días mostraron la pérdida de una de las etapas del ciclo estral en los ratones. La etapa de estro, se da en un pico de estrógenos que promueve la ovulación, además en el cérvix uterino, el aumento de estrógenos provoca la aparición de una gran cantidad de células queratinizadas, las cuales se muestran en el frotis vaginal. De esta manera, se sugiere fuertemente que el tamoxifeno está uniéndose a

su receptor y evita la unión de los estrógenos, ya que estas células queratinizadas características no logran verse en ninguno de los ratones tratados durante los 90 días.

En los tejidos, los resultados obtenidos muestran que en el cérvix y el útero hay un aparente aumento del receptor a estrógenos beta y una disminución en la expresión de Eag1.

Estos resultados coinciden con un efecto antiestrogénico del tamoxifeno, indicando que bajo este modelo de estudio, el efecto en estos órganos es similar a lo que ocurre normalmente en la mama y por lo cual es utilizado como terapia.

Los dos tipos de receptores a estrógenos que se conocen (α y β), parecen tener funciones contrarias, aunque ambos receptores interactúan con los mismos elementos de respuesta en el DNA y tienen características similares de unión a ligando.⁵

Los estrógenos y su unión al RE α inducen la transcripción de genes involucrados en la proliferación celular, por lo que aumentan el número de células que pasan de una fase Go/G1 y entran al ciclo celular, mientras que el RE β (aunque también induce la transcripción de genes), parece tener un efecto protector, por lo que se ha sugerido ser un supresor de tumores en mama.⁴

En tejidos donde el RE α es el predominante, este parece regular las funciones de crecimiento y desarrollo del tejido, mientras que cuando el RE β es el dominante este ejerce dichas funciones. Sin embargo, cuando los dos receptores están presentes se favorece la formación de heterodímeros por lo que la transcripción de genes depende de ambos receptores.^{8, 47}

Se sabe que un incremento en la expresión de RE β sobre RE α inhibe la respuesta del RE α a los estrógenos silenciando el efecto agonista parcial y potenciando su efecto antagonista. Además es un represor de la actividad transcripcional de RE α en condiciones de premenopausia, como en el modelo que se llevó a cabo en este estudio.⁶

Incluso se ha reportado que en estas mismas condiciones, la expresión de RE β disminuye la sensibilidad del RE α al estradiol, ya que en condiciones normales la afinidad de los estrógenos es 5 veces mayor por el RE α que por el β .¹¹

El tamoxifeno funciona como agonista en células donde solo está expresado el RE α , mientras que cuando se expresan los dos tipos de receptores, la habilidad del tamoxifeno para activar la transcripción de genes mediada por el RE α es completamente suprimida.¹¹

En pacientes se ha determinado que las alteraciones provocadas por el tamoxifeno, mediadas por su efecto agonista parcial se observan en mujeres postmenopáusicas, es decir con niveles bajos de estrógenos.²⁷ Todo esto lleva a confirmar que bajo el modelo de estudio, donde hay niveles altos de estrógenos, el tamoxifeno actúa como antagonista en el cérvix y el útero, dando como resultado un aumento en la expresión del RE β . En estos tejidos, el RE α es el predominante, mientras que la expresión del RE β es muy baja, por lo que al aumentar la expresión de este por el tamoxifeno estaría regulando la actividad del RE α disminuyendo de esta manera la proliferación celular, además del efecto citostático que se sabe que produce.⁸ Esta disminución en la proliferación celular podría asociarse con una aparente disminución de la expresión del canal de potasio Eag1 tanto a nivel de RNAm como de proteína, el cual se conoce por tener un potencial oncogénico y participar en la proliferación celular. Además, se sabe que el canal Eag1 es regulado por factores etiológicos como los estrógenos en presencia del RE α , por lo que era de esperarse un cambio en la expresión del canal en el modelo utilizado.

Aún falta por saber cómo se da la regulación de Eag1 por el RE β , sin embargo, se sabe que el canal Eag1 es regulado por factores etiológicos, entre ellos los estrógenos, por lo que es interesante conocer que el RE β puede estar implicado en su regulación de alguna manera.

Con estos resultados se puede sugerir que para observar el efecto agonista del tamoxifeno es necesario modificar el modelo de estudio, tratando de igualar las condiciones en las cuales las pacientes con cáncer de mama consumen este fármaco. Entre los factores más importantes a considerar están los niveles de estrógenos, los cuales deben ser muy bajos para emular la etapa postmenopáusica, además de otros factores como el tiempo de tratamiento y la dosis administrada. Incluso deben considerarse la interacción con otros fármacos, ya que como se sabe, las pacientes con cáncer de mama no solo

consumen un fármaco, sino una combinación que permite mejorar la respuesta frente a este tipo de cáncer.

En el caso del ovario no se observó ningún cambio en la expresión de *Eag1* o el receptor a estrógeno β como ocurrió en el cérvix y el útero, y tampoco se observó alguna tendencia de aumento o disminución del $RE\alpha$, indicando que el modelo de tratamiento no crea las condiciones necesarias para mostrar claramente un efecto agonista o antagonista en el ovario. En la mujer premenopáusica, el tamoxifeno actúa como antagonista en el hipotálamo, aumentando la producción de FSH, estimulando la producción de gonadotropinas, aumentando la esteroidogénesis y por lo tanto, aumentando la formación de quistes ováricos.³⁰

Además, en el ovario de manera normal se encuentran los dos tipos de receptores, aunque distribuidos diferencialmente en el tipo celular. El $RE\alpha$ se encuentra principalmente en las células de la teca, mientras que el $RE\beta$ se observa en las células de la granulosa.³

De esta manera, los resultados encontrados en el ovario no se correlacionan con los efectos reportados, probablemente el tiempo o la dosis de tratamiento no fueron suficientes para mostrar una diferencia en la expresión de alguno de estos genes.

8 CONCLUSIONES

La aparente disminución de la expresión de Eag1 puede asociarse al aumento del receptor a estrógenos beta, lo cual indica un efecto antiestrógeno en el cérvix y el útero a este tiempo de tratamiento.

9 PERSPECTIVAS

Aplicar el tratamiento con tamoxifeno en un modelo con niveles de estrógenos bajos, simulado un tratamiento en la etapa postmenopáusica.

Estudiar la regulación de la expresión de RE beta sobre la regulación de Eag1.

10 BIBLIOGRAFÍA

1. Noriega-Reyes, Y.; Langley McCarron, E., Correguladores del receptor de estrógenos y su implicación en el cáncer mamario. *Cancerología* **2008**; Vol. 3, pp 29-40.
2. Latrich, C.; Schüler, S.; Häring, J.; Skrzypczak, M.; Ortmann, O.; Treeck, O., Effects of a combined treatment with tamoxifen and estrogen receptor β agonists on human breast cancer cell lines. *Arch Gynecol Obstet* **2013**, 2970-7.
3. Pearce, S. T.; Jordan, V. C., The biological role of estrogen receptors alpha and beta in cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* **2004**, 50 (1), 3-22.
4. Ascenzi, P.; Bocedi, A.; Marino, M., Structure-function relationship of estrogen receptor alpha and beta: impact on human health. *Mol Aspects Med* **2006**, 27 (4), 299-402.
5. Marino, M.; Galluzzo, P.; Ascenzi, P., Estrogen signaling multiple pathways to impact gene transcription. *Curr Genomics* **2006**, 7 (8), 497-508.
6. Nilsson, S.; Gustafsson, J., Estrogen receptors: therapies targeted to receptor subtypes. *Clin Pharmacol Ther* **2011**, 89 (1), 44-55.
7. Roman-Blas, J. A.; Castañeda, S.; Largo, R.; Herrero-Beaumont, G., Osteoarthritis associated with estrogen deficiency. *Arthritis Res Ther* **2009**, 11 (5), 241.
8. Drummond, A. E.; Fuller, P. J., The importance of ERbeta signalling in the ovary. *J Endocrinol* **2010**, 205 (1), 15-23.
9. Acconcia, F.; Marino, M., The Effects of 17 β -estradiol in Cancer are Mediated by Estrogen Receptor Signaling at the Plasma Membrane. *Front Physiol* **2011**, 2, 30.

10. Marino, M.; Acconcia, F.; Ascenzi, P., Estrogen receptor signalling: bases for drug actions. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord* **2005**, *5* (3), 305-14.
11. Pettersson, K.; Delaunay, F.; Gustafsson, J. A., Estrogen receptor beta acts as a dominant regulator of estrogen signaling. *Oncogene* **2000**, *19* (43), 4970-8.
12. Deroo, B. J.; Korach, K. S., Estrogen receptors and human disease. *Journal Clinical Investigation* **2006**, *116* (3), 561-70.
13. Burns, K. A.; Korach, K. S., Estrogen receptors and human disease: an update. *Arch Toxicol* **2012**, *86* (10), 1491-504.
14. Häring, J.; Schüler, S.; Lattrich, C.; Ortmann, O.; Treeck, O., Role of estrogen receptor β in gynecological cancer. *Gynecol Oncol* **2012**, *127* (3), 673-6.
15. Dobrzycka, K. M.; Townson, S. M.; Jiang, S.; Oesterreich, S., Estrogen receptor corepressors -- a role in human breast cancer? *Endocr Relat Cancer* **2003**, *10* (4), 517-36.
16. Hsia, E. Y.; Goodson, M. L.; Zou, J. X.; Privalsky, M. L.; Chen, H. W., Nuclear receptor coregulators as a new paradigm for therapeutic targeting. *Adv Drug Deliv Rev* **2010**, *62* (13), 1227-37.
17. Jordan, V. C., The secrets of selective estrogen receptor modulation: cell-specific coregulation. *Cancer Cell* **2002**, *1* (3), 215-7.
18. Heery, D. M.; Kalkhoven, E.; Hoare, S.; Parker, M. G., A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors. *Nature* **1997**, *387* (6634), 733-6.
19. Rozenbaum, H., Selective estrogen receptor modulators (SERM) *Gynécologie: EMC (Elsevier Masson SAS, Paris)*, **2008**, 92-A-10.

20. Albain, K.; Barlow, W.; Ravdin, P.; Farrar, W.; Burton, G.; Ketchel, S.; Cobau, C.; Levine, E.; Ingle, J.; Pritchard, K.; Lichter, A.; Schneider, D.; Abeloff, M.; Henderson, I.; Muss, H.; Green, S.; Lew, D.; Livingston, R.; Martino, S.; Osborne, C.; American, B. C. I. N., Adjuvant chemotherapy and timing of tamoxifen in postmenopausal patients with endocrine-responsive, node-positive breast cancer: a phase 3, open-label, randomised controlled trial. *Lancet* **2009**, *374* (9707), 2055-2063.
21. IARC, Some pharmaceutical drugs. Tamoxifen. *IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans*: **1996**; *66*, 1–514.
22. Fisher, B.; Costantino, J.; Wickerham, D.; Redmond, C.; Kavanah, M.; Cronin, W.; Vogel, V.; Robidoux, A.; Dimitrov, N.; Atkins, J.; Daly, M.; Wieand, S.; Tan-Chiu, E.; Ford, L.; Wolmark, N., 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* **1998**, *90* (18), 1371-1388.
23. Kiyotani, K.; Mushiroda, T.; Nakamura, Y.; Zembutsu, H., Pharmacogenomics of tamoxifen: roles of drug metabolizing enzymes and transporters. *Drug Metab Pharmacokinet* **2012**, *27* (1), 122-31.
24. Hertz, D. L.; McLeod, H. L.; Irvin, W. J., Tamoxifen and CYP2D6: a contradiction of data. *Oncologist* **2012**, *17* (5), 620-30.
25. Cohen, I., Aromatase inhibitors and the endometrium. *Maturitas* **2008**, *59* (4), 285-292.
26. Christov, K.; Ikui, A.; Shilkaitis, A.; Green, A.; Yao, R.; You, M.; Grubbs, C.; Steele, V.; Lubet, R.; Weinstein, I., Cell proliferation, apoptosis, and expression of cyclin D1 and cyclin E as potential biomarkers in tamoxifen-treated mammary tumors. *Breast Cancer Research and Treatment* **2003**, *77* (3), 253-264.

27. Navarro, D., Moduladores selectivos del receptor estrogénico. Su utilidad en la mujer posmenopáusica. *Revista Colombiana de Endocrinología*: **2001**; 12, 124-127.
28. Understanding Cancer Series. *National Cancer Institute*: **2012**.
29. Cohen, I., Endometrial pathologies associated with postmenopausal tamoxifen treatment. *Gynecologic Oncology* **2004**, 94 (2), 256-266.
30. Polin, S.; Ascher, S., The effect of tamoxifen on the genital tract. *Cancer Imaging* **2008**, 8 (1), 135-145.
31. Kuo, D.; Runowicz, C., Gynecological Effects of Tamoxifen. *Medical Oncology* **1995**, 12 (2), 87-94.
32. Bermejo-Aycart, J. I.; Iniesta-Pérez, S.; San Frutos-Llorente, L.; Gallego-Villaescusa, I.; Bajo-Arenas, J., Tamoxifen effect on vaginal epithelium and ovaries. *Prog. Obst. Ginecol.* **2006**, 66-71.
33. Gill, B.; Simpson, J.; Somlo, G.; McGonigle, K.; Wilczynski, S., Effects of tamoxifen on the cytology of the uterine cervix in breast cancer patients. *Diagnostic Cytopathology* **1998**, 19 (6), 417-422.
34. MSD, Cánceres del aparato reproductor femenino. *Merck Sharp & Dohme de España*: **2005**.
35. Camacho, J., Ether a go-go potassium channels and cancer. *Cancer Letters* **2006**, 233 (1), 1-9.
36. Downie, B.; Sánchez, A.; Knotgen, H.; Contreras-Jurado, C.; Gymnopoulos, M.; Weber, C.; Stuhmer, W.; Pardo, L., Egl1 expression interferes with hypoxia homeostasis

and induces angiogenesis in tumors. *Journal of Biological Chemistry* **2008**, 283 (52), 36234-36240.

37. Pardo, L.; del Camino, D.; Sánchez, A.; Alves, F.; Bruggemann, A.; Beckh, S.; Stuhmer, W., Oncogenic potential of EAG K⁺ channels. *Embo Journal* **1999**, 18 (20), 5540-5547.

38. Rodríguez-Rasgado, J.; Acuna-Macías, I.; Camacho, J., Eag1 channels as potential cancer biomarkers. *Sensors* **2012**, 12 (5), 5986-5995.

39. Napp, J., Tesis Doctoral. 2003.

40. Asher, V.; Sowter, H.; Shaw, R.; Bali, A.; Khan, R., Eag and HERG potassium channels as novel therapeutic targets in cancer. *World Journal Surg Oncol* **2010**, 8, 113.

41. Hemmerlein, B.; Weseloh, R.; de Queiroz, F.; Knotgen, H.; Sanchez, A.; Rubio, M.; Martin, S.; Schliephacke, T.; Jenke, M.; Heinz-Joachim-Radzun; Stuhmer, W.; Pardo, L., Overexpression of EagI potassium channels in clinical tumours. *Molecular Cancer* **2006**, 5 (41).

42. Farías, L.; Ocana, D.; Díaz, L.; Larrea, F.; Ávila-Chávez, E.; Cadena, A.; Hinojosa, L.; Lara, G.; Villanueva, L.; Vargas, C.; Hernández-Gallegos, E.; Camacho-Arroyo, I.; Duenas-González, A.; Pérez-Cárdenas, E.; Pardo, L.; Morales, A.; Taja-Chayeb, L.; Escamilla, J.; Sánchez-Pena, C.; Camacho, J., Ether a go-go potassium channels as human cervical cancer markers. *Cancer Research* **2004**, 64 (19), 6996-7001.

43. Dáaz, L.; Ceja-Ochoa, I.; Restrepo-Angulo, I.; Larrea, F.; Ávila-Chávez, E.; García-Becerra, R.; Borja-Cacho, E.; Barrera, D.; Ahumada, E.; Gariglio, P.; Álvarez-Ríos, E.; Ocadiz-Delgado, R.; García-Villa, E.; Hernández-Gallegos, E.; Camacho-Arroyo, I.; Morales, A.; Ordaz-Rosado, D.; García-Latorre, E.; Escamilla, J.; Sánchez-Pena, L.; Saqui-Salces, M.; Gamboa-Domínguez, A.; Vera, E.; Uribe-Ramirez, M.; Murbartian, J.; Ortiz,

C.; Rivera-Guevara, C.; De Vizcaya-Ruiz, A.; Camacho, J., Estrogens and human papilloma virus oncogenes regulate human Ether-a-go-go-1 potassium channel expression. *Cancer Research* **2009**, *69* (8), 3300-3307.

44. García-Quiroz, J.; Garcia-Becerra, R.; Barrera, D.; Santos, N.; Ávila, E.; Ordaz-Rosado, D.; Rivas-Suárez, M.; Halhali, A.; Rodríguez, P.; Gamboa-Domínguez, A.; Medina-Franco, H.; Camacho, J.; Larrea, F.; Díaz, L., Astemizole synergizes calcitriol antiproliferative activity by inhibiting CYP24A1 and upregulating VDR: A novel approach for breast cancer therapy. *Plos One* **2012**, *7* (9).

45. Ortiz, C.; Montante-Montes, D.; Saqui-Salces, M.; Hinojosa, L.; Gamboa-Domínguez, A.; Hernández-Gallegos, E.; Martínez-Benítez, B.; Solis-Pancoatl, M.; Garcia-Villa, E.; Ramirez, A.; Aguilar-Guadarrama, R.; Gariglio, P.; Pardo, L.; Stuhmer, W.; Camacho, J., Eag1 potassium channels as markers of cervical dysplasia. *Oncology Reports* **2011**, *26* (6), 1377-1383.

46. Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. . México, 1999.

47. Monroe, D. G.; Secreto, F. J.; Subramaniam, M.; Getz, B. J.; Khosla, S.; Spelsberg, T. C., Estrogen receptor alpha and beta heterodimers exert unique effects on estrogen- and tamoxifen-dependent gene expression in human U2OS osteosarcoma cells. *Mol Endocrinol* **2005**, *19* (6), 1555-68.