

NUEVOS CONCEPTOS SOBRE HORMONODEPENDENCIA EN EL CANCER DE MAMA

EMANUEL LEVIN, SILVANA P. CARUSO, ANDREA M. ACTIS, ROSA W. de LEVIN

Departamento de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

Resumen La presencia o ausencia de receptores a estrógenos y a progesterona en las neoplasias mamarias es el criterio más generalizado para definir su grado de hormono-dependencia. Actualmente, nuevos conocimientos sobre la funcionalidad de estos receptores, imponen revisar este criterio. Receptores estrogénicos con delecciones o mutaciones en el dominio de unión a ligandos, pueden ser calificados como negativos por ensayos bioquímicos o inmunocitoquímicos y sin embargo, pueden conservar su actividad regulatoria sobre la transcripción genómica. Receptores calificados como positivos, pueden presentar alteraciones en otros dominios y no ejercer su función reguladora normal, con lo cual, el crecimiento celular aparece como autónomo. La organización modular de la molécula del receptor posibilita la relativa independencia funcional de sus dominios. Las pruebas funcionales para receptores permiten conocer su respuesta en diferentes situaciones experimentales y clínicas. Un ensayo de desplazamiento con tamoxifén, mide la afinidad relativa del tamoxifén y del estradiol por el receptor estrogénico, con implicancia directa para el uso de este antiestrógeno en oncología mamaria. Las interacciones proteína-proteína entre receptores esteroideos y otros factores transcripcionales (cross-talk) influyen significativamente sobre el mensaje transcripcional. Cambios conformacionales o mutaciones en algunas de estas moléculas pueden modificar estas interacciones, que se traducen en efectos no esperados sobre la proliferación celular. Derivados antiprogestínicos pueden comportarse como agonistas de progesterona, cuando se asocian con análogos de AMPc y en otros casos, análogos de AMPc presentan efectos opuestos sobre el crecimiento celular, según sea el tipo de hormonodependencia de los tumores. Diversas proteínas asociadas a los receptores esteroideos modulan su actividad transcripcional y pueden ser uno de los blancos farmacológicos para influenciar dicha regulación. Estas complejidades ayudan a explicar los fenómenos de resistencia a tratamientos antihormonales que se observan en la evolución de las neoplasias mamarias y que superan el simple criterio de presencia o ausencia de receptores esteroideos, para definir su grado de hormono-dependencia.

Palabras clave: cáncer de mama, receptores hormonales, tamoxifén

Las hormonas sexuales y la proliferación celular en el tejido mamario

La mama es un órgano glandular complejo, cuyo desarrollo depende de una serie de factores, entre los cuales las hormonas esteroideas

desempeñan un papel fundamental. A partir de la pubertad, los ciclos ováricos, con la producción seriada y cíclica de estas hormonas van creando alternancias en el desarrollo del tejido mamario, uno de los «blancos» de las hormonas sexuales¹. Diversos factores de crecimiento también participan en el recambio y organización celular de la mama y están a su vez modulados por las hormonas esteroideas². Tanto estas hormonas como los factores de crecimiento ejercen su acción a través de receptores específicos para cada ligando y están sujetos a mecanismos

Recibido: 12-VI-1996

Aceptado: 25-X-1996

Dirección postal: Dr. Emanuel Levin, Departamento de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, UBA, Paraguay 2155, 1121 Buenos Aires, Argentina

regulatorios complejos que controlan la proliferación, la diferenciación, la apoptosis y el recambio celular en el tejido mamario normal.

Cuando se produce una transformación neoplásica en las células epiteliales mamarias, los mecanismos de regulación se alteran y la proliferación celular deja de estar debidamente controlada. Aproximadamente en un 70% de los cánceres de mama se constata un aumento en el contenido de receptores estrogénicos (RE) y en proporción algo menor, se incrementa también la expresión de receptores a progesterona (RPg)³. En general se acepta que la presencia o ausencia de estos receptores determina el carácter dependiente o autónomo del crecimiento celular en el cáncer de mama, lo que a su vez condiciona el tipo de tratamiento antitumoral. Por los métodos convencionales de detección (bioquímicos, inmunohistoquímicos) sólo un porcentaje reducido de células revela su presencia en el tejido mamario normal. Los receptores esteroideos son factores transcripcionales que modulan la expresión de diversos genes, bastando para ello unas pocas moléculas para cumplir esa función,⁴ aunque no sean detectables por las técnicas habituales. La concepción más aceptada desde los trabajos pioneros de Jensen⁵, es que las hormonas esteroideas ejercen sus efectos transcripcionales a través de receptores nucleares específicos. Otras acciones de las hormonas esteroideas reconocen mecanismos extragenómicos que no involucran directamente a los receptores nucleares⁶.

Siendo los receptores esteroideos reguladores de la proliferación celular normal, la pérdida de una proteína regulatoria, conjuntamente con la activación de oncogenes que estimulan el crecimiento celular, puede llevar a la transformación maligna y a la progresión del proceso neoplásico. De tal manera, tanto el aumento en el contenido de receptores esteroideos, que se observa en aproximadamente 70% de las neoplasias mamarias, como su desaparición, señalan que se halla alterada la regulación de los procesos de proliferación/diferenciación celular.

Se han establecido valores de «corte» por encima de los cuales se considera que el tumor es receptor positivo y por debajo de esos valores se lo define como receptor negativo. Esta nomenclatura simplifica el concepto de dependencia o de autonomía hormonal en el crecimiento

descontrolado de las células del epitelio mamario. Aun cuando factores de crecimiento y otros productos de oncogenes pueden tener predominio como estímulos para el crecimiento celular, en general son modulados en la mama por las hormonas sexuales. De tal manera, la llamada hormono-independencia para el crecimiento celular en el cáncer de mama, no refleja los efectos indirectos del complejo hormona-receptor sobre los factores de crecimiento y sus receptores, así como sobre las demás moléculas transcripcionales⁷. Además, en la actualidad se conoce que mutaciones y truncamientos en la molécula receptora pueden ejercer profunda influencia sobre sus funciones regulatorias. Es decir, que aparte de regulaciones cuantitativas («up» y «down regulation») existen otras cualitativas («side regulation»⁸) capaces de alterar los controles biológicos sobre el crecimiento y la proliferación celular.

Receptores hormonales normales y alterados

Se ha encontrado que en tumores mamarios clasificados como ER-RPg+, hay formas moleculares del receptor con delección de su dominio de unión a la hormona y que por el ensayo bioquímico de binding serían considerados como RE-⁹. Sin embargo, estos RE tienen capacidad para unirse al ADN y expresar sus funciones transcripcionales, aunque en forma distorsionada. De igual modo, en vez de truncamiento de todo el dominio de unión a hormonas, pueden existir mutaciones en uno o más aminoácidos de este segmento. Estas moléculas truncadas o mutadas del receptor pueden formar heterodímeros con los receptores normales, lo cual altera la unión de estos últimos con el ADN (formas dominantes negativas)¹⁰.

Por otro lado, hay tumores clasificados como RE+ que presentan mutaciones en su molécula. En estos casos, está conservado el dominio de unión o binding a la hormona y las modificaciones se encuentran en otros segmentos de la molécula o bien, los cambios en el dominio E, de unión a ligandos, no llegan a suprimir el binding a la hormona¹¹. En la Fig. 1 se muestra un esquema de la organización en «cassette» o módulos de la molécula de RE y de variantes que se

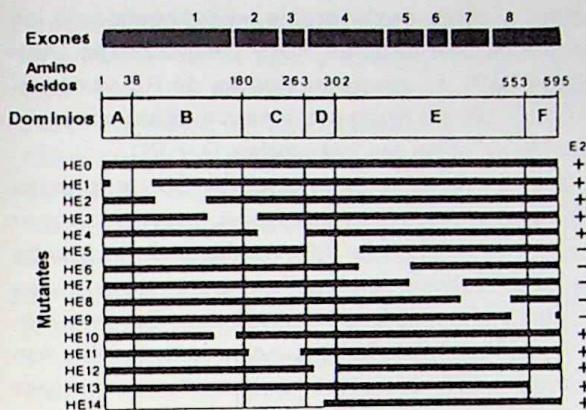


Fig. 1.— Estructura de la molécula de RE y de mutantes por delección. (modificada de ¹²). Se señalan sus 6 dominios y los aminoácidos que los limitan. El NH₂ terminal se encuentra en el comienzo del dominio A y el COOH terminal, al final del dominio F. La barra de exones representa los segmentos de ADN que codifican al RE. No se corresponden exactamente con los dominios funcionales. Por mutagénesis dirigida se obtuvieron 14 mutantes. Las interrupciones en las barras indican los aminoácidos faltantes. La molécula normal (wild) corresponde a HEO con sus 595 aminoácidos. La columna E2 indica cuales son las mutantes que unen estradiol (+). Las que presentan delecciones en el dominio E, no unen estradiol (-). Funciones de los dominios de RE: Dominio A/B (AF1): Transactivación (unión a factores transcripcionales y a proteínas accesorias; no dependiente de estrógenos). Dominio C: Unión a los segmentos promotores de ADN (ERE). Dominio D: Bisagra; Facilita el plegamiento de la molécula. Traslación núcleo-citoplasma-núcleo (shuttling). Dominio E: Unión a ligandos específicos (E2, antiestrógenos). Transactivación E2 dependiente (AF2). Dimerización (necesaria para unirse al ADN). Dominio F: Modulación del dominio E.

han encontrado en tumores mamarios humanos, así como otras variantes creadas en ensayos de laboratorio por mutagénesis dirigida.

A esta complejidad en la estructura de la proteína receptora, se agregan las interrelaciones y contactos con otras proteínas transcripcionales, que se ha dado en llamar «cross-talk» (conversación cruzada), como expresión de cambios conformacionales (disposición espacial, equilibrio de isoformas) y bioquímicos (fosforilaciones, estado de óxido-reducción) que se generan en la intimidad del nucleoplasma, que es el complejo de proteínas y ADN que se encuentra en la cromatina genómica¹³. Estos contactos interproteicos (interacciones físico-químicas, no uniones) se expresan en cambios de funcionalidad de los

receptores hormonales y de las demás moléculas transcripcionales intervenientes. Así, cambios en la fosforilación del RE, que se expresan modificando la transcripción de diversos genes, pueden ser evocados por compuestos que actúan sobre proteínas de la vía de AMPc (CREB, CREM, subunidades de PKA), que a su vez, por cross-talk con los receptores esteroideos, inducen la activación de los RE¹⁴. Es decir, que aun en ausencia de estrógenos se puede estimular su receptor por intermedio de otras proteínas transcripcionales.

Pruebas funcionales para los receptores

Desde los comienzos de las determinaciones cuantitativas de receptores hormonales en tejido tumoral mamario, se viene postulando la importancia de ensayos que puedan reflejar diversas modalidades de su funcionalismo. En clínica oncológica mamaria, las pruebas relacionadas con la respuesta a tratamientos hormonales fueron adquiriendo mayor relevancia, dado que las predicciones basadas solamente en el dosaje cuantitativo de RE, presentaban un porcentaje considerable de excepciones (alrededor de 40%). La presencia de RPg fue la primera prueba funcional indicadora de buen funcionamiento de los RE, llevando a 70-80% la proporción de tumores con respuesta favorable a terapias antiestrogénicas. Se han propuesto ensayos basados en la afinidad del estradiol (E2)¹⁵ o bien, del tamoxifen (Tam)¹⁶, como medida de la potencia de estos ligandos para unirse al RE. Fueron aproximaciones más racionales que permitían conocer la «fuerza» de dichas uniones. Pero no tuvieron en cuenta que una misma molécula receptora podía presentar afinidades diferentes para cada uno de estos ligandos, a pesar de que la interacción se produjera con el mismo dominio del receptor. Recientemente, Jensen y colaboradores¹⁷ refieren que en el dominio del RE para ligandos, existen dos sitios con diferente afinidad para E y para Tam, lo cual podría explicar en parte los fenómenos de resistencia que se observan con el uso de esta droga en el cáncer de mama.

En nuestro laboratorio hemos desarrollado una prueba funcional que mide simultáneamente las afinidades de E2 y de Tam en la misma muestra

de tejido¹⁸. Así pudimos establecer el Índice de Desplazamiento (ID), que expresa la afinidad relativa de estos ligandos por el RE en cada tumor. Esto nos ha permitido diferenciar entre los tumores mamarios RE+, los que tienen mayor o menor sensibilidad al desplazamiento de la unión E2-RE por el Tam, teniendo en cuenta la afinidad del E2. No excluye que otras expresiones funcionales del RE, como la biosíntesis de RPg y la activación de otros genes relacionados con la proliferación celular, se manifiesten de modo diferente. Esto indica que la molécula receptora puede expresar al mismo tiempo modificaciones de ciertas propiedades funcionales, mientras otras se mantienen normales y ello se debe a la organización en cassette de la molécula receptora, con relativa autonomía funcional para cada dominio.

La prueba se practica desde 1987 en muestras de tumores mamarios de pacientes operados en los servicios de oncología y de patología mamaria de los hospitales Teodoro Alvarez, Vélez Sarsfield y Tigre. Luego de 8 años se puede evaluar la correspondencia entre la predicción de sus resultados y la evolución de los pacientes. En el período 1987-95 se efectuaron dosajes de RE y RPg en 947 muestras, en las que se practicaron 210 pruebas de desplazamiento. En la Tabla 1 se consignan los datos de sobrevida de 30 casos, con neoplasias mamarias RE+, estadíos I y II, a los 5 y a los 8 años de su operación.

En el momento de la operación, siendo todos tumores RE+, se calificó como favorable el pronóstico de los pacientes con tumores Desplazables y como desfavorable, el pronóstico de los pacientes con tumores Poco Desplazables (Ampliada de¹⁹). El rango de valores de RE varió entre 12 y 486 fm E/mg proteína sin diferencias significativas entre las categorías D y PD.

En un modelo experimental de neoplasias mamarias ductales en ratón, inducidas por medroxiprogesterona (MPA) utilizamos la prueba de desplazamiento con Tam para explorar los posibles mecanismos involucrados. En este modelo, se hallan dos subpoblaciones tumorales con distinto grado de hormono dependencia proges-tínica: una de ellas, hormono-autónoma (HA), no modifica su velocidad de crecimiento con la administración de MPA; la otra, hormono-dependiente (HD), de crecimiento más lento, acelera su desarrollo con MPA²⁰. Ambas subpoblaciones expresan RPg y RE²¹. La administración de MPA, que se une al RPg, disminuye el ID en la subpoblación de tumores HA, sin modificar los niveles cuantitativos de RE. El ID expresa cuantitativamente la afinidad relativa de E y de Tam por el RE. En la subpoblación de tumores HD, el tratamiento con MPA no hace variar el ID, pero aumentan los niveles de RE⁸. Se encontró que estos cambios estaban relacionados con el equilibrio de isoformas de RE. En la sublínea HA aparecía una isoforma de menor tamaño molecular (correspondiente a la forma mono-mérica), que no se hallaba en la sublínea HD. Por lo tanto, atribuimos a esta isoforma la característica de presentar disminución en el ID, que habíamos observado en los tumores HA. Así constatamos que en esta sublínea se modifica una propiedad funcional del RE sin variaciones en su nivel cuando se administra MPA; en cambio, en la sublínea HD aumenta el contenido de RE sin que cambie el ID ni el perfil de isoformas del receptor. Significa que puede haber modificaciones en las propiedades funcionales de un receptor sin que cambie su contenido y a la vez, puede variar su cantidad sin expresar cambios en algunas de sus funciones.

Farmacología de las variantes de receptores esteroideos

El perfil de isoformas y sus fluctuaciones dinámicas tienen gran importancia en la regulación funcional de los receptores esteroideos. El RPg

TABLA 1.- Sobrevida de 30 pacientes con neoplasias mamarias RE+

Tumores (Prueba de Desplazamiento)	Estadíos I y II (Número de pacientes)	
	Tiempo de evolución 5 años de sobrevida	8 de años de sobrevida
Desplazables (21 pacientes)	18 (90%)	14 (67%)
Poco Desplazables (9 pacientes)	3 (33%)	0

presenta constitutivamente las isoformas A y B, la primera, de 94 kDa y la isoforma B, de 114 kDa, con 164 aminoácidos más en el extremo COOH terminal. Estas isoformas, en diversas situaciones fisiológicas y farmacológicas, pueden exhibir cambios notables en respuestas biológicas dependientes de este receptor. Así, el agente antiprogestínico RU486 inhibe la expresión del gen CAT (cloramfenicol amino transferasa) transfecido en células neoplásicas T47D; la Pg y otros análogos progestínicos, la estimulan. Cuando el RU486 se utiliza con 8-Br-AMPc, análogo del AMPc, se invierte el efecto inhibidor y en estas condiciones se activa al gen CAT²². La vía del AMPc es una de las vías bioquímicas de fosforilación de los receptores esteroideos y las proteínas que la integran son factores transcripcionales que entran en estrecho contacto con los receptores nucleares. Las interacciones (cross-talk) entre RPg y proteínas de AMPc se modifican cuando el RPg está unido al antagonista RU486, y llevan a un cambio conformacional en la molécula del receptor. En presencia de 8-Br-AMPc, el complejo RU486-RPg distorsionado, se fija al ADN y el contacto con las proteínas de AMPc ya no se produce de igual modo, lo que altera el mensaje transcripcional y se estimula la expresión del gen CAT²². Esta inversión de efectos puede manifestarse también sobre propiedades farmacológicas del AMPc. Otro de sus análogos, el 8-Cl-AMPc (8Cl) presenta acciones antitumorales sobre varias líneas celulares transformadas y sobre tumores experimentales²³, así como sobre neoplasias mamarias humanas²⁴. En el modelo de tumores mamarios murinos que hemos descripto más arriba, el 8Cl inhibe el desarrollo tumoral en la sublínea HA; en cambio, en la sublínea HD, estimula su crecimiento²⁵. En este caso, el efecto opuesto del análogo se manifiesta según el grado de hormono-dependencia a la progesterona que presentan estos tumores. Nuestra hipótesis es que estas respuestas se deben a variantes de la molécula de RPg en una y otra sublínea tumoral. Las variantes pueden expresarse en cambios conformacionales, distinta proporción de isoformas A y B, cambios en las proteínas accesorias de RPg, distinto grado de fosforilación o bien, las variantes ya no acceden al ADN nucleosómico²⁶. Estos y otros mecanismos aún no debidamente dilucidados, pueden

modificar el cross-talk entre RPg y proteínas de la vía AMPc.

Para el RE, también es posible citar cambios profundos de efectos farmacológicos por alteraciones estructurales en la molécula receptora. La sustitución de glicocola por valina, correspondiente al codón 400 del dominio E del RE que une ligandos, trae por consecuencia que el antiestrógeno OH-Tam ejerza una fuerte estimulación sobre el crecimiento de una línea celular transfecida con esta mutante²⁷. Ya hemos visto que otras propiedades del RE, como la afinidad relativa E2/Tam por el receptor, pueden cambiar cuando se modifica la proporción de sus isoformas⁸.

Proteínas accesorias

Otra de las características que modulan la actividad de los receptores esteroideos, es la interacción con proteínas citoplásmicas y nucleares a las que se unen y de las que se separan en las diversas etapas funcionales que van transitando. Varias proteínas de shock térmico (hsp) contribuyen a la estabilización de los receptores citoplasmáticos cuando la hormona no está presente y se separan cuando el receptor se une al ligando. En algunos casos, la hsp 70 queda unida aún después de la llegada de la hormona²⁸. En el núcleo, tanto algunas hsp de menor tamaño molecular (45, 48, 55 kDa), como otras proteínas no-hsp, se mantienen unidas al receptor cuando se forma el complejo RE-ADN con los llamados elementos respondedores específicos del ADN (ERE). Estas proteínas adyuvantes o accesorias incrementan la actividad de los receptores esteroideos, que sin ellas se expresa (la actividad singular) en niveles basales bajos²⁹. No están suficientemente estudiados los mecanismos de esta modulación transcripcional por proteínas accesorias. Compuestos como el Tam, que actúan sobre los receptores, afectan su conformación, lo que puede traducirse en cambios de la unión con los ERE, en el grado y lugar de las fosforilaciones, en el cross-talk con otros factores transcripcionales y en la asociación de los receptores con sus proteínas accesorias. Por ejemplo, cultivos de células CHO transfecadas con RE, tratadas con OH-Tam, llevan al debilitamiento

to de la unión RE-hsp70, desestabilizando el complejo RE-ADN que también contiene la hsp asociada. Igual ocurre con las hsp de 45 y 48 kDa²⁸. Un capítulo que recién se inicia, es el examen de las interacciones en células de tumores mamarios con distinto grado de hormono-dependencia. El cambio de propiedades agonistas a antagonistas y viceversa, que se observa en compuestos antiprogestínicos y antiestrogénicos, se atribuye a variaciones conformacionales en la molécula del receptor, que pueden ser diferentes en poblaciones hormono-autónomas y hormono-dependientes. Ciertamente, los cambios conformacionales que son capaces de alterar el cross-talk entre proteínas transcripcionales, también pueden modificar la unión de los receptores con las proteínas accesorias que regulan su actividad transcripcional. Cabe preguntarse cuáles de los efectos farmacológicos se ejercen sobre estas proteínas accesorias, que a su vez pueden influir diferencialmente sobre la respuesta de los receptores, según el grado de dependencia hormonal de los tumores.

Autonomía hormonal y resistencia farmacológica

Frente a estas complejidades, es comprensible que los fenómenos de resistencia que aparecen en el tratamiento de las neoplasias mamarias, no tengan una causa única y sean tan difíciles de contrarrestar. La propia autonomía hormonal que presentan algunos tumores mamarios, tampoco es un proceso unívoco y tanto en tumores humanos como en líneas celulares, es posible revertir farmacológicamente este fenotipo biológico³⁰. Si bien no son homólogos los conceptos de autonomía y de resistencia hormonal en las neoplasias mamarias, conviene puntualizar sus alcances, ya que sus fluctuaciones sustentan los criterios de hormono-dependencia en estas neoplasias.

Hormono autonomía: El desarrollo del tumor prescinde de hormonas esteroideas para la proliferación y para el crecimiento celular. Se debe a la ausencia constitutiva de receptores esteroideos o bien, a fallas funcionales de los mismos.

Hormono resistencia: Tumores y cultivos celulares que requieren hormonas esteroideas para su desarrollo y que son frenados en su crecimiento

por tratamientos antiestrogénicos, de pronto o gradualmente ya no responden a estos tratamientos. Pasan a comportarse como hormono autónomos o bien, responden a estrógenos para su crecimiento, pero no se inhiben con anties-trógenos.

Citamos algunos de los mecanismos conocidos de hormono resistencia que sobrevienen en la evolución del cáncer de mama. Unos ataúnen a factores biológicos propios del tejido y otros, a los agentes antiestrogénicos. Por supuesto, son confluientes, ya que las respuestas farmacológicas dependen de interacciones huésped-droga.

1. La heterogeneidad celular en el tejido tumoral mamario neoplásico, se expresa en la coexistencia de subpoblaciones con clones de células RE+ y clones RE-. Los tratamientos antiestrogénicos van eliminando o diferenciando las células RE+ como respuesta al tratamiento. Las células RE- remanentes se van multiplicando hasta constituir el grueso de la población tumoral, con lo cual la neoplasia ya no responde a los tratamientos antiestrogénicos³¹.

2. La inestabilidad genética de las células tumorales favorece la aparición de subclones con diferentes características biológicas, como mutaciones o delecciones en la molécula de RE, que ya no se une al Tam o lo hace con baja afinidad, aunque pueda conservar mayor afinidad por estradiol. El Tam puede llegar a estimular el desarrollo de células mamarias transformadas, debido a mutaciones puntuales del RE³².

3. La molécula del receptor hormonal puede presentar una secuencia normal de aminoácidos y no responder a estrógenos para el crecimiento celular ni a los antiestrógenos para frenarlo. Se atribuye la insensibilidad del receptor a fallas en la interacción con otras vías transduccionales (cross-talk alterado). En estos casos, cambios en la conformación o en la agregación de la molécula receptora o bien, en moléculas correspondientes a otras vías, son responsables de las respuestas farmacológicas anómalas^{22, 25}.

4. Aumentos en la producción focal de factores de crecimiento, son capaces de contrarrestar el efecto inhibitorio de antiestrógenos sobre la proliferación celular, en tumores RE+³².

5. El Tam, al unirse a RE y bloquear su unión a E2, favorece un aumento en los niveles de estrógenos circulantes, lo cual puede llegar a revertir el efecto antitumoral del Tam. La relación de concentraciones entre ambos ligandos estable-

ce un equilibrio dinámico de competencia por el RE. En esto se basa la indicación de ooforectomía, que reduce los niveles de estrógenos en mujeres premenopáusicas, para favorecer y potenciar la acción antitumoral del Tam³³.

6. En el tejido mamario existen proteínas distintas al RE, que unen específicamente al Tam. Su aumento en las neoplasias puede llevar a una retención del antiestrógeno, disminuyendo su disponibilidad para la unión al RE³⁴.

7. Algunos metabolitos del Tam presentan formas isoméricas con débil acción estrogénica. Cambios en el equilibrio de estos isómeros pueden modificar la respuesta, cuando predominan metabolitos con efectos estrogénicos fuertes³⁵.

La Tabla 2 resume las principales causas de resistencia a los tratamientos hormonales en el cáncer de mama.

TABLA 2.- Resistencia a antiestrógenos

Causas	Referencias
1. Heterogeneidad celular (clones RE+ y RE-)	29, 34
2. Adaptación de clones RE+ al crecimiento con antiestrógenos	37
3. Inestabilidad genética. Aparición de RE modificados por mutaciones o delecciones	11, 27, 36
4. Cambios en la interacción con otras vías transduccionales (cross-talk alte-rado)	14, 25
5. Mayor producción de factores de crecimiento	7, 32
6. Aumento de sitios de unión antiestrogénicos (extra RE)	34
7. Aumento en los estrógenos circulantes	38
8. Aumento de metabolitos de antiestrógenos con mayor actividad estrogénica	35
9. Cambios en las proteínas accesorias de RE	28, 29
10. Cambios en el complejo Tam-RE-ERE variando la regulación genómica	30
11. Expresión disminuida de RE (down-regulation)	39
12. Fallas en la traslocación núcleo-cito-plasmática y viceversa (shuttling) de los RE	40

¿Puede cambiar la hormono-dependencia de un tumor a lo largo de su evolución? La aparición de fenómenos de resistencia a antiestrógenos indica que así sucede en el curso de un tratamiento. Y este cambio ocurre preferencialmente de clones RE+ a RE-. En tumores humanos es poco frecuente el cambio inverso, de RE- a RE+, pero en líneas celulares constitutivamente RE-, se ha logrado por transfección con vectores que introducen el ADN que lo codifica⁴¹. En la mayor parte de los casos el gen RE transfecado no es funcionalmente equivalente al RE endógeno⁴². En un tumor que responde a tratamientos hormonales, la aparición de metástasis señala que la enfermedad progresiona y se inician tratamientos quimioterápicos. Luego de algunas series, en ciertos casos, la vuelta a terapias antiestrógenas puede frenar transitoriamente la progresión de la enfermedad. ¿Indica esto que han aparecido clones RE+ o bien, que receptores alterados vuelven a su fenotipo normal, respondiendo a los antiestrógenos? También es posible que el Tam produzca efectos antitumorales por vías ajenas al bloqueo de RE^{43, 44}, que por un tiempo retarden la progresión de la metástasis. Son alternativas posibles, difíciles de establecer en cada caso, dado el pleomorfismo de la enfermedad. Sin duda, la biología molecular está contribuyendo a dilucidar las complejidades de este laberinto biológico que habrá de desembocar en la derrota del cáncer.

Summary

New concepts on hormone dependence in breast cancer

The type of hormone dependence in mammary neoplasias is usually defined by the presence or absence of estrogen and progesterone receptors. At present, new advances in the knowledge related to the functionality of these receptors are changing our previous concepts. Estrogen receptors classified as negative by biochemical or immunocytochemical methods because of deletions or mutations in their ligand-binding domain, are still able to regulate the expression of genes related to cellular proliferation. Receptors defined as positive, may present other defective domains with disappearance or distortion of their transcriptional function. As a result, regulation of the cellular proliferative process is distorted and the

tumoral growth seems autonomous, as if the receptors were absent. The modular organization of the receptor molecule allows a relative functional independence of the constitutive domains.

Functional assays to evaluate receptor behavior under different experimental or clinical situations are necessary. A displacement assay with tamoxifen, for studying the relative binding affinity of tamoxifen and estradiol for the estrogen receptor contributes to a more appropriate use of this antiestrogen in mammary oncology. Conformational changes and mutations in one or several of these genomic molecules may alter the transcriptional message with repercussion on cellular proliferation. In this way, antiprogestinic agents can show progestin agonistic effects when combined with cAMP analogues; on the other hand, opposite effects on cellular growth by cAMP analogues can be observed according to the type of hormone dependency (autonomous or dependent) of the tumors.

Modulation of steroid receptor transcriptional activity is also achieved through non-transcriptional proteins associated to the receptor molecule. These proteins are then potential targets for the pharmacological regulation of the transcription message. Resistance to antihormone treatments in breast cancer is a dominant feature in the evolution of this malignancy. It cannot be attributed to the presence or absence of steroid receptors when only defined by their quantitative variations.

Bibliografía

1. Russo J, Tay LK, Russo HI. Differentiation of the mammary gland and susceptibility to carcinogenesis. *Breast Cancer Res Treat* 1982; 2: 5-73.
2. Freiss G, Pébois C, Vignon F. Control of breast cancer growth by steroids and growth factors: Interactions and mechanisms. *Breast Cancer Res Treat* 1993; 27: 57-68.
3. Wittliff JL. Steroid hormone receptors in breast cancer. *Cancer* 1984, 53: 630-43.
4. Noguchi S, Motomura K, Inaji H, Imaoka S, Koyama H. Up-regulation of estrogen receptor by tamoxifen in human breast cancer. *Cancer* 1993; 71: 1266-72.
5. Jensen EV, Jacobson HI. Basic guides to the mechanism of estrogen action. *Recent Prog Horm Res* 1962; 18: 387-414.
6. Brann DW, Hendry LB, Mahesh VB. Emerging diversities in the mechanism of action of steroid hormones. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1995; 52: 113-33.
7. Steward AG, Westley BR, May FEB. Modulation of the proliferative response of breast cancer cells to growth factors by estrogen. *Br J Cancer* 1992; 66: 640-8.
8. Actis AM, Caruso SP, Levin E: Estrogen receptor isoforms and progestin hormone dependence in a mouse mammary tumor model. *Int J Cancer* 1994, 58: 668-71.
9. Fuqua SAW, Fitzgerald SE, Chamness GC, Tandon AK, McDonnell PD, Nawaz Z, O'Malley BW, McGuire WL: Variant human breast tumor estrogen receptor with constitutive transcriptional activity. *Cancer Res* 1991; 51: 205-9.
10. Yen PM, Chin WW. Molecular mechanisms of dominant negative activity by nuclear hormone receptors. *Mol Endocrinol* 1994; 8: 450-4.
11. Raam S, Robert N, Pappas CA, Tamra H. Defective estrogen receptors in human mammary cancers: their significance in defining hormone dependence. *J Natl Cancer Inst* 1989; 80: 756-61.
12. Kumar V, Green S, Staub A, Chambon P: Localisation of the estrogen-binding and putative DNA-binding domains of the human estrogen receptor. *EMBO J* 1986, 5: 2231-6.
13. Levin E, Caruso SP, Actis AM: Factores transcripcionales y diversidad proliferativa de las células neoplásicas: *Medicina Buenos Aires*; 1994; 54: 589-95.
14. Aronica SM, Kraus WL, Katzenellenbogen BS: Estrogen activation via cAMP signaling pathway: Stimulation of adenylate cyclase and cAMP-regulated gene transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 8517-21.
15. Bloom ND, Fishman JH: Tamoxifen treatment failures in hormonally responsive breast cancers. Correlation with steroid receptors. *Cancer* 199, 52: 1190-4.
16. Friedl A, Jonat W. Affinität des mit Östradiol besetzten Östrogen receptors für tamoxifen. *Tumor Diagnos Ther* 1988; 9: 242-6.
17. Hedden A, Müller V, Jensen EV. A new interpretation of antiestrogen action. *Ann N Y Acad Sci* 1995; 761: 109-20.
18. Levin E, Tomchinsky S, Lopez SJ. Displacement by tamoxifen of the estradiol-estrogen receptor binding: a functional assay for breast cancer studies. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1990; 37: 681-6.
19. Levin E, Caruso S, Actis A. Functional expressions of estrogen receptors in experimental and human mammary tumors. *Endocrine Related Cancer* 1995; 2: 111-3.
20. Lanari C, Molinolo AA, Pasqualini CD: Induction of mammary carcinomas by medroxyprogesterone acetate in BALB/c female mice. *Cancer Lett* 1986; 33: 215-23.
21. Molinolo AA, Lanari C, Charreau EH, Sanjuan N, Pasqualini CD: Mouse mammary tumors induced by medroxyprogesterone acetate: immunohistochemistry and hormonal receptors. *J Natl Cancer Inst* 1987; 79: 1341-50.
22. Beck CA, Weigel NL, Moyer ML, Nordeen SK, Edwards DP: The progesterone antagonist RU486 acquires agonist activity upon stimulation of cAMP signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 4441-5.
23. Cho-Chung YS, Clair T, Tortora G, Yokosaki H: Role of site selective cAMP analogues in the control and reversal of malignancy. *Pharmac Ther* 1991; 50: 1-33.

24. Tortora G, Ciardiello F, Pepe S, Tagliaferri P, Ruggiero A, Bianco C, Guerrasi R, Miki K, Bianco AR: Phase I clinical trial with 8-Chloro-cAMP and evaluation of immunological effects in cancer patients. *Clin Cancer Res* 1995; 1: 377-84.
25. Actis AM, Caruso SP, Levin E: Opposite effect of a cAMP analogue on tumoral growth related to hormone dependence of a murine mammary tumor. *Cancer Lett* 1995; 96: 81-5.
26. Truss M, Bartsch, Schelbert A, Haché RJG, Beato M: Hormone induces binding of receptors and transcription factors to a rearranged nucleosome on the MMTV promoter in vivo. *EMBO J* 1995; 14: 1737-51.
27. Jiang SY, Langan-Fahey SM, Stella AM, McCague R, Jordan VC: Point mutation of estrogen receptor (ER) in the ligand-binding domain changes the pharmacology of antiestrogens in ER-negative breast cancer cells stably expressing complementary DNA for ER. *Mol Endocrinol* 1992; 6: 2167-74.
28. Landel CC, Kushner PJ, Greene GL: The interaction of human estrogen receptor with DNA is modulated by receptor associated proteins. *Mol Endocrinol* 1994; 8: 1407-19.
29. Smith D, Toft D: Steroid receptors and their associated proteins. *Mol Endocrinol* 1993; 7: 4-11.
30. Metzger D, Berry M, Ali S, Chambon P: Effects of antagonists on DNA binding properties of the human estrogen receptor in vitro and in vivo. *Mol Endocrinol* 1995; 9: 579-91.
31. Brunner N, Clarke R, Lippman ME, Dickson RB: Models for studying the progression from hormone-dependency to independency in human breast cancer. In: Growth regulation of cancer. Lippman ME, Dickson RB (eds) New York: Alan Liss; 1990; 115-25.
32. Morrow M, Jordan VC: Molecular mechanisms of resistance to tamoxifen therapy in breast cancer. *Arch Surg* 1993; 128: 1187-91.
33. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group: Systemic treatment of early breast cancer by hormonal, cytotoxic, or immune therapy. 133 randomized trials involving 31,000 recurrences and 24,000 deaths among 75,000 women. *Lancet* 1992; 339: 1-15.
34. Levin E, Schuarzberg P: Receptores a antiestrógenos ¿para qué sirven? *Medicina (Buenos Aires)* 1990; 50: 74-80.
35. Wolf DM, Langan Fahey SM, Parker CJ, McCague R, Jordan VC: Investigation of the mechanisms of tamoxifen-stimulated breast tumor growth with non-isomerizable analogues of tamoxifen and metabolites. *J Natl Cancer Inst* 1993; 85: 806-12.
36. Fuqua SAW: Estrogen receptor mutagenesis and hormone resistance. *Cancer* 1994; 74: 1026-9.
37. Clarke R, Lippman ME: Antiestrogen resistance: mechanisms and reversal. In: Drug resistance in oncology. Teicher BA (ed) New York: Deckker; 1992, p 501-36.
38. Jordan VC, Fritz NF, Langan Fahey S, Thompson M, Tormey DC: Alteration of endocrine parameters in premenopausal women with breast cancer during long-term adjuvant tamoxifen monotherapy. *J Natl Cancer Inst* 1991; 83: 1488-91.
39. Ree AH, Mani SK, Walaas SI, et al: Down-regulation of messenger ribonucleic acid and protein levels for estrogen receptors by phorbol ester and calcium in MCF-7 cells. *Endocrinology* 1991; 129: 339-44.
40. Levin E, Actis AM, Lopez S: Characterization of rat uterine estrogen receptor in vivo. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1993; 37: 681-5.
41. Levenson AS, Jordan VC: Transfection of human estrogen receptor (ER) cDNA into ER-negative mammalian cell lines. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1994; 51: 229-39.
42. Wats CKW, King RJB: Overexpression of estrogen receptor in HTB 96 human osteosarcoma cells results in estrogen-induced growth inhibition and receptor cross-talk. *J Bone Miner Res* 1994; 9: 1251-8.
43. Greenberg DA, Carpenter CL, Messing RO: Calcium channel antagonist properties of the antineoplastic antiestrogen tamoxifen in the PC12 neurosecretory cell line. *Cancer Res* 1987; 47: 70-4.
44. Kiss Z: Tamoxifen stimulates phospholipase D activity by an estrogen receptor independent mechanism. *FEBS Lett* 1994; 355: 173-7.

- - -

La Ciencia es profundamente revolucionaria pues obliga a evolucionar a la Sociedad, la Industria, la Universidad, el ejercicio profesional. Esta es la causa por la cual es terriblemente resistida. Pero esta resistencia suele ser disfrazada de miles de maneras, mientras se simula profesar admiración a la Ciencia y se pretende ayudarla. En otros casos se la ayuda, pero sólo cuando se puede emplearla en provecho propio, de un gobierno, una industria o la reputación de un individuo.

Bernardo A. Houssay (1887-1971)

El papel de la Ciencia. *Anales de la Sociedad Científica Argentina* 1950; CL: 197-209