



**Área de Fisiología
Departamento de Ciencias de la Salud
Facultad de Ciencias Experimentales y de la Salud
Universidad de Jaén**

**ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ESPECÍFICA PIRROLIDÓN
CARBOXIPEPTIDASA (PCP) EN LAS LÍNEAS CELULARES DE
CÁNCER DE MAMA HUMANO ESTRÓGENO-DEPENDIENTE Y
ESTRÓGENO-INDEPENDIENTE MCF-7 Y EVSA-T Y SU
RESPUESTA AL ESTRADIOL Y EL TAMOXIFENO**

**Belén Oya Álvarez de Morales
Trabajo de Investigación Tutelado
Jaén, 2005**

1. INTRODUCCIÓN

1.1. EL CÁNCER DE MAMA

El cáncer de mama es una enfermedad conocida desde el Antiguo Egipto. Un papiro datado entre los años 1600-1500 a.C. refleja, probablemente, la primera cita de un carcinoma mamario de la historia. Por tanto nos encontramos ante una antigua enfermedad, que ha llegado a ser la enfermedad maligna más común causante de muerte entre las mujeres de la Comunidad Europea, incrementándose en los países del Este (O'Higgins, 1992; Miller *et al.*, 1982).

En los años 80 se modificaron conceptos relacionados con el tratamiento quirúrgico y la curación del cáncer de mama, gracias al conocimiento de la biología molecular del inicio y progresión del cáncer así como de la interacción tumor-paciente: se demostraba que el perfil hormonal paracrina y autocrina de la mama en el momento de la extirpación del cáncer modulaba el curso posterior de la enfermedad. Se llegó así a la conclusión de que los mismos factores que eran responsables de la proliferación del tejido mamario normal durante la pubertad y de los cambios cíclicos del ciclo menstrual, están implicados en la promoción, progresión y aparición del cáncer de mama (Forbes, 1997).

El fracaso en la erradicación de esta enfermedad se debe, fundamentalmente, a la dificultad de identificar a un agente etiológico específico, de precisar el momento de inicio y de conocer los mecanismos moleculares responsables del inicio y progresión del cáncer. A pesar de los numerosos desaciertos en torno al origen del cáncer, existen evidencias de que el riesgo de cáncer de mama está relacionado con factores endocrinológicos y reproductivos. Por otro lado, estudios genéticos, epidemiológicos y clínicos han identificado una serie de parámetros biológicos y sociales como factores de riesgo asociados al cáncer de mama. Algunos de ellos serían la evidencia de genes susceptibles, como BRCA1 y BRCA2, la historia familiar de cáncer de mama, ovario o endometrio, la historia individual de desórdenes mamarios, edad avanzada, estatus socioeconómico alto, exceso en la exposición a radiaciones ionizantes o consumo de alcohol (Mettlin, 1999; Pike *et al.*, 1993; Bernstein y Ross, 1993; Hu *et al.*, 2000).

La glándula mamaria es, de hecho, la localización más frecuente de tumores y/o neoplasmas. El término tumor y neoplasma son aplicados indistintamente a lesiones malignas y benignas porque el término tumor (del latín *tumere*) significa cualquier aumento patológico o nuevo crecimiento, como neoplasma (del griego *neos*, nuevo y *plasma*, formación) (Dorland, 1974).

Los tumores benignos son aquellos que no invaden tejidos adyacentes, no se metastatizan a órganos distantes y pueden ser eliminados por extirpación local.

Suelen crecer de forma lenta a lo largo de los años, formando masas cohesivas que permanecen localizadas en su lugar de origen, siendo el fibroadenoma (lesión bien delimitada, de consistencia elástica, que contiene tanto elementos epiteliales como fibrosos) el mas frecuente en la mama femenina. Los tumores malignos, son neoplasmas caracterizados por su habilidad para invadir, metastizarse y en último término, causar la muerte del hospedador, siendo el carcinoma ductal infiltrante el tipo histológico de cáncer de mama más frecuente (65-80 %) (Russo y Russo, 1996a).

La malignidad o benignidad tumoral, ya sean tumores inducidos mediante un carcinógeno o generados de forma espontánea e puede determinar por criterios derivados de un examen macroscópico, histopatológico y analizando el comportamiento biológico del tumor. Los principales criterios a tener en cuenta en un examen macroscópico, una vez realizado un examen general del tumor, son el índice de crecimiento y la apariencia macroscópica. Normalmente los tumores malignos tienden a tener un crecimiento muy rápido. En cuanto a la apariencia macroscópica, los carcinomas en general son suaves y carnosos, están muy bien vascularizados y tienen zonas de necrosis y hemorragias, e incluso algunos pueden contener sangre y material necrotizado, a diferencia de los fibroadenomas que son blancos, con una consistencia firme y elástica.

Entre los criterios histopatológicos de malignidad, el más importante es la pérdida del modelo tubular-alveolar de la glándula mamaria normal. Citológicamente, las células malignas son más grandes que sus homologas normales y existe un incremento en la proporción nucleocitoplasmática (Russo y Russo, 2000). La heterogeneidad epitelial presente en la glándula mamaria normal o incluso en las lesiones benignas, donde podemos encontrar células mioepiteliales, oscuras, intermedias o claras, raramente se observa en lesiones malignas (Russo *et al.*, 1983). El tipo celular predominante en lesiones malignas es de tipo intermedio, siendo difícil encontrar células oscuras. Por otro lado, el número de mitosis es generalmente mayor en lesiones malignas que en benignas (Russo y Russo, 1987).

En cuanto al criterio biológico de malignidad más fiable, sería la capacidad de un tumor de metastizarse hacia órganos distantes, aunque la habilidad de lesiones neoplásicas para generar angiogénesis ha sido también propuesta para ser un marcador biológico de malignidad, aunque todavía su uso no está muy extendido (Brem *et al.*, 1978; Maiorana y Gullino, 1978).

Se ha sugerido que el desarrollo de metástasis a distancia es una etapa tardía en la progresión de carcinoma mamario, que ocurre por adquisición de alteraciones genéticas que hacen a la célula competente para colonizar y proliferar

en los distintos órganos. No obstante, algunos estudios han planteado una hipótesis alternativa, al encontrar no solo que algunas metástasis no comparten los cambios moleculares de los tumores primarios, sino que además, metástasis en órganos distintos de un mismo primario divergen también en su perfil genético (Kuukasjarvi *et al.*, 1997). Así mismo se indica el carácter específico de los genes implicados en la metástasis en distintos órganos, siendo diferentes los implicados, por ejemplo, en las metástasis óseas frente a las de glándula suprarrenal.

De hecho, el proceso de tumorigénesis mamaria resulta de la progresión de benigno a maligno, donde la acumulación de múltiples cambios genéticos desencadenan la evolución de un epitelio normal mamario a través de lesiones proliferativas benignas, a lesiones proliferativas atípicas, finalizando en carcinomas *in situ* y tumores invasivos.

Es difícil, a la vista de los conocimientos actuales, enumerar lesiones que en sentido estricto puedan considerarse iniciales del cáncer mamario. Desde principios del siglo XIX se conoce que la enfermedad mamaria benigna pueda ser precursora del cáncer y por estudios más recientes, ya históricos, que algunas lesiones, en particular hiperplasias y carcinomas *in situ*, pueden preceder al carcinoma invasivo, existiendo un aparente continuo histológico entre ellos y también una presencia coincidente en la misma mama. Hay mujeres con procesos mamarios, como hiperplasias usuales, hiperplasias atípicas y carcinomas *in situ* que tienen un incremento en el riesgo relativo de padecer cáncer (Page *et al.*, 1985).

El dogma biológico del cáncer parece cumplirse también en la mama, considerándose que un cáncer invasivo está precedido por una serie de pasos intermedios. En un sentido general y quizás inapropiado, algunas de estas etapas, especialmente las que conllevan mayor riesgo de cáncer invasivo se consideran lesiones iniciales del carcinoma. Otras, como el carcinoma ductal *in situ*, además tienen algún rasgo fenotípico de malignidad, pero carecen de la habilidad de invadir y metastizar, por lo que en este sentido son lesiones premalignas, preinvasivas o precursoras (González-Palacios, 2003).

1.2. LA ACTIVIDAD PIRROLIDÓN CARBOXIPEPTIDASA.

La pirrolidón carboxipeptidasa (Pcp), también conocida como piroglutamil aminopeptidasa es una omega-peptidasa que hidroliza residuos piroglutamil terminales de péptidos, proteínas y derivados de arilamidas de manera altamente selectiva, jugando un papel fisiológico en la regulación de la circulación de péptidos biológicamente activos como la hormona liberadora de tirotrópina (TRH) y la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH). Sin embargo, aunque su acción

hidrolítica sobre péptidos y sustratos artificiales ha sido ampliamente estudiada, el papel fisiológico de esta enzima y su mecanismo de regulación no son bien conocidos. Otros estudios han sugerido la influencia de esteroides gonadales sobre esta actividad en suero, existiendo la posibilidad de que estas sustancias ayuden a crear un ambiente bioquímico que regule, al menos en parte, la actividad de estas enzimas.

Existen dos actividades específicas y diferenciadas de la pirrolidón carboxipeptidasa según la localización, la actividad pirrolidón carboxipeptidasa I, localizada a nivel citosólico, y la actividad pirrolidón carboxipeptidasa II, localizada a nivel de membrana (también llamadas piroglutamato aminopeptidasas I y II, Pcp I y Pcp II, respectivamente). También se ha descrito esta actividad a nivel del suero, donde se le denomina tiro liberinasa (Cummins y O'Connor, 1998).

1.2.1. Pirrolidón Carboxipeptidasa I

- *Clasificación de peptidasas*: Clan CF, familia C15, MEROPS ID: C15.010

- *Clasificación enzimática del NC-UIBM*: E.C. 3.4.19.3.

Acción. Libera un grupo piroglutámico N-terminal de péptidos y proteínas, no siendo el segundo aminoácido Pro, además de aminoacil-~~S~~naftilamidas, aminoacil-metilcumarinas y aminoacil-~~D~~nitroanilidas.

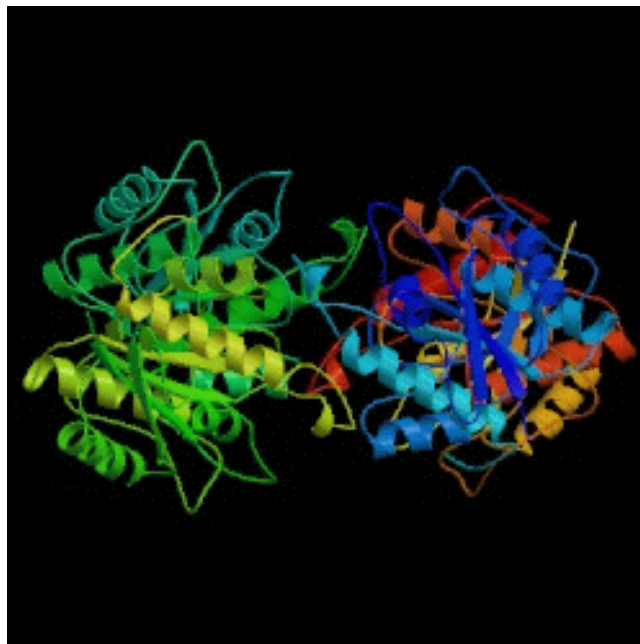


Figura 1. Estructura tridimensional propuesta para la enzima pirrolidón carboxipeptidasa I.

Sustrato artificial. pGlu-~~S~~naftilamida

Propiedades

moleculares. Cistein-peptidasa monomérica de 24 KDa y pH óptimo entre 6.5-8.5. es un enzima sulfidril-dependiente, mostrando un requerimiento estricto de agentes como el DTT o 2-mercaptoetanol (2-ME). Se inhibe por iodoacetamida y otros agentes bloqueantes de grupos sulfidrilos. También es muy sensible a trazas de metales pesados. Tiene dos residuos de Cys, uno de los cuales está implicado en su actividad catalítica (*Figura 1.*).

Distribución. Exopeptidasa ampliamente distribuida por diferentes especies y tejidos a nivel citosólico, tales como músculo esquelético, cerebro y riñón.

Aspectos

biológicos. Capaz de liberar residuos piroglutámicos N-terminales de péptidos biológicamente activos, incluyendo TRH, GnRH, neurotensina y bombesina. Aunque su papel no está claro todavía, puede contribuir al catabolismo intracelular de péptidos hacia aminoácidos libres, los cuales pueden ser reincorporados a rutas biosintéticas (Mantle *et al.*, 1991).

1.2.2. Pirrolidón carboxipeptidasa II

- *Clasificación de peptidasas:* Clan MA, familia M1, MEROPS ID: M01.008

- *Clasificación enzimática del NC-UIBMB:* E.C. 3.4.19.6.

Acción. Libera el grupo piroglutámico N-terminal de tripéptidos pGlu-His-X y tetrapéptidos pGlu-His-X-Gly, con estrecha especificidad por sustratos como la TRH, además de el Glu del Glu-His-Pro-~~S~~naftilamidas.

Sustrato artificial. pGlu-~~S~~naftilamida

Propiedades

moleculares. Metalopeptidasa glicosilada, zinc-dependiente de alto peso molecular, 230 KDa, formada por dos subunidades. Se inhibe por 1,10-fenantrolina y agentes quelantes como el EDTA. PH óptimo de 7.3.

Distribución. Ectoenzima localizada concretamente como proteína integral de membrana en la superficie de células neuronales (no células gliales), aunque también se encuentra en todo el SNC, retina, pulmón y otros tejidos.

Aspectos

biológicos. La alta especificidad por su sustrato TRH o análogos de TRH (Wilk, 1989). Está regulada por hormonas tiroideas (Schomburg y Bauer, 1995) y estrógenos (Cummins y O'Connor, 1998) de forma específica de tejido.

1.2.3. La actividad pirrolidón carboxipeptidasa y el cáncer de mama

Si bien se sabe que la participación hormonal tanto en el desarrollo normal como de carcinomas en la mama es fundamental, es más limitado el conocimiento que se tiene de algunos enzimas reguladores de hormonas peptídicas, como es el caso de la Pcp. Se han llevado a cabo algunos estudios tanto en modelos animales (inducidos por N-metil-nitrosourea -NMU-) como en humanos. La inducción de tumores mediante NMU se caracteriza por inducir tumores estrógeno dependientes (Rose *et al.*, 1980), siendo uno de sus principales atributos que la proporción de carcinomas mamarios que son ovario-dependientes es similar a la observada en la enfermedad en humanos (Luet *et al.*, 1998). La dependencia estrogénica de dichos tumores inducidos mediante NMU podría relacionarse con la disminución observada en la actividad Pcp en el suero de estos animales. Trabajos previos mostraron cambios en la actividad Pcp en cáncer de mama en mujeres, a nivel de tejido tumoral y adyacente, confirmándose que cambios en esta enzima o en sus posibles sustratos pueden tener un importante papel en la patogénesis del cáncer de mama (Martínez *et al.*, 1999).

Ya que uno de los sustratos susceptibles de la Pcp es la GnRH, la disminución observada en su actividad indicaría la existencia de altos niveles circulantes de esta hormona peptídica. En este sentido, se han localizado en tejido mamario receptores para GnRH (GnRH-R), sugiriéndose un papel local de la GnRH

en la glándula mamaria humana (Kottler *et al.*, 1997). También han sido inmunolocalizados GnRH-R en el citoplasma de células tumorales e incluso en el citoplasma de células morfológicamente normales del epitelio glandular adyacente al carcinoma. Aunque se han encontrado GnRH-R tanto en tejido normal como en tumoral, la presencia de GnRH-R fue superior en tejido tumoral que en el no tumoral (Paradiso *et al.*, 2000). De cualquier forma el aumento en los niveles de GnRH conduce a un incremento en los niveles de hormonas esteroideas gonadales (Huirne y Lambalk, 2001) como el estradiol, que estimula tanto la actividad mitótica como el crecimiento del tejido epitelial mamario, conduciendo a un aumento de la sensibilidad al carcinógeno. Por tanto la disminución de la actividad Pcp, nos podría hacer suponer un aumento de los niveles de GnRH, lo que se traduce en un aumento en la producción de hormonas esteroideas gonadales, responsables, al menos en parte del inicio y desarrollo de esta enfermedad.

Como hemos comentado, el riesgo de cáncer de mama, esta fuertemente influenciado por parámetros endocrinos y reproductivos (Russo *et al.*, 2001).

El aumento en los niveles de GnRH supondría un aumento en los niveles de esteroides sexuales. De hecho, se han localizado receptores, tanto para estradiol y progesterona como para prolactina y el factor de crecimiento epitelial (EGF, del inglés Epithelial Growth Factor) en tumores desarrollados en rata siguiendo este mismo modelo. La localización de receptores para estrógenos en el total de los tumores, sugiere una sensibilidad uniforme a la manipulación hormonal, es decir, hormono dependencia. En humanos, el hecho de que las células proliferantes sean distintas de aquellas que son positivas para ER y PgR, apoyan los datos que indican que los estrógenos controlan la proliferación celular por mecanismos indirectos.

En este sentido, la actividad proliferativa y el mayor porcentaje de células positivas para ER y PgR se encuentra en las estructuras lobulares tipo1. Hecho que justifica el que estas estructuras sean las que tienen un mayor grado de susceptibilidad para ser transformadas por carcinógenos *in vitro* (Russo *et al.*, 1998; Russo *et al.*, 1993), apoyando igualmente las observaciones de que las estructuras Lob 1 son el origen de carcinomas ductales (Russo *et al.*, 1990).

Sin embargo, también se ha descrito tanto en la glándula mamaria de rata como en humanos, ARNm tanto para GnRH como para receptores de GnRH. Este péptido puede actuar de forma autocrina o paracrina, aunque, en el caso de la rata esta expresión solo ha sido detectada en ratas gestantes o lactantes, pero no en ratas vírgenes (Levi *et al.*, 1996).

En el modelo animal de cáncer de mama, la actividad específica Pcp en la propia mama mostró un incremento significativo en su actividad soluble (Pcp I) y

unida a membrana (Pcp II) que podría ser consecuencia de los altos niveles circulantes de GnRH, regulando de este modo su función autocrina / paracrina a nivel de la mama. En este sentido, estudios llevados a cabo en nuestro laboratorio muestran un descenso notable de la actividad Pcp II en tejido adyacente y neoplásico de pacientes con cáncer de mama, si bien la actividad Pcp soluble no muestra ningún cambio. Las diferencias en el comportamiento de dicha actividad en glándula mamaria, sugiere que modificaciones en esta enzima o en su sustrato juegan un importante papel en el cáncer de mama aunque queda por delimitar exactamente el mecanismo de acción (Martínez *et al.*, 1999).

En este sentido, el hecho de que no existan diferencias en la expresión del ARNm del receptor de GnRH entre ratas vírgenes, gestantes y lactantes, implica que la activación de los receptores de GnRH en glándula mamaria está regulada por la disponibilidad de GnRH (Levi *et al.*, 1996). Estos datos apoyarían los resultados obtenidos para la actividad Pcp en este modelo. Como también se ha descrito, la actividad Pcp hipotalámica, que no está sujeta a una regulación por estrógenos u otras hormonas, también disminuye significativamente, favoreciendo el incremento de los niveles circulantes de GnRH. A modo de resumen podemos indicar que los cambios en la actividad Pcp en el tejido tumoral supone una respuesta a niveles potencialmente elevados de GnRH, que pueden modificar la función autocrina / paracrina de esta hormona a nivel de la mama (*Figura 2.*).

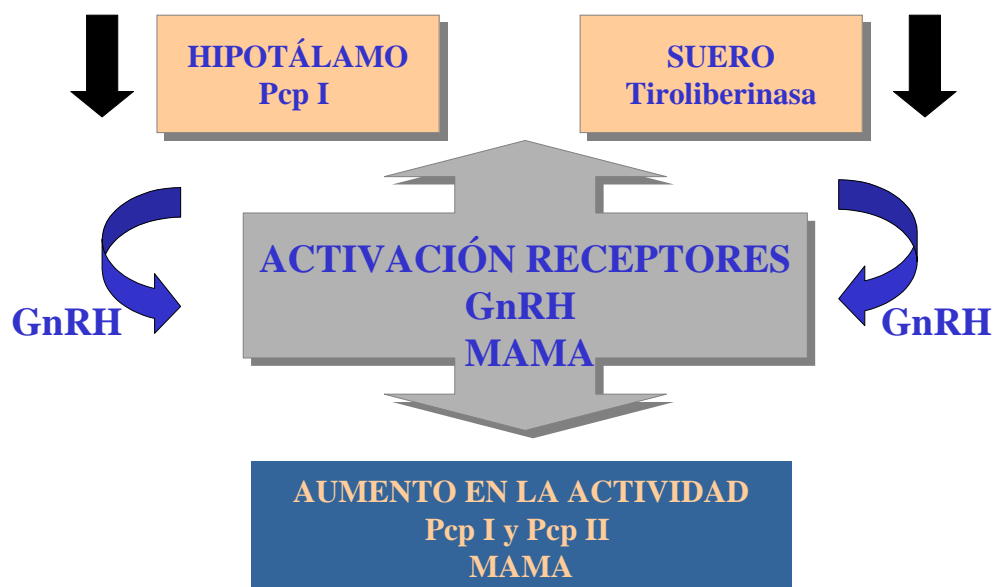


Figura 2. Posible relación de las actividades Pcp hipotalámica, sérica y mamaria en la determinación de los niveles de GnRH en glándula mamaria.

2. PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS

El cáncer de mama es la causa de muerte más común producida por tumores entre las mujeres del mundo desarrollado. Los mecanismos de regulación hormonal del crecimiento del tumor han sido descritos para los tumores de mama, las líneas celulares y los tumores inducidos experimentalmente. La enzima pirrolidón carboxipeptidasa (Pcp) está modificada en cáncer de mama humano en cáncer de mama de rata, en un modelo inducido por N-metil-nitrosourea, lo que indica que esta actividad participa en la patogénesis del cáncer de mama. Puesto que diversos estudios demuestran, además, la influencia de las hormonas sexuales sobre la actividad Pcp tanto en humanos como en roedores (Martínez et al., 1998; 1999b; Ramírez-Expósito et al., 2001; García et al., 2001) el objetivo de este trabajo es analizar la respuesta de la actividad Pcp, tras la incubación con estradiol y tamoxifeno, en las líneas celulares de cáncer de mama humano estrógeno-dependiente MCF-7 (Darbre y Dali, 1989; Byford et al., 2002) y estrógeno-independiente EVSA-T (Villalobos et al., 1996; del Moral et al., 1991). El tamoxifeno es un modulador selectivo de los receptores de estrógenos, que inhibe de forma competitiva la unión del estradiol a sus receptores (Jordan y Dowse, 1976). Mediante este mecanismo, interfiere en diversos mecanismos celulares implicados en la regulación de la división celular. Las interferencias causadas por el tamoxifeno modifica el perfil de factores de crecimiento en los tejidos diana y provoca que las células se detengan en la fase G₁ del ciclo celular (Osborne et al., 1983; Colleti et al., 1989). Esto induce cambios en los mecanismos de proliferación celular del tumor y con ello, muerte celular. El resultado neto obtenido es una respuesta antitumoral del tamoxifeno (Cameron et al., 2000; Cameron et al., 2001) y con ello, un incremento de la supervivencia (Yao y Jordan, 1998).

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Cultivos Celulares

En el presente estudio se han utilizado las líneas celulares humanas de cáncer de mama hormono-dependiente MCF-7 y hormono-independiente EVSA-T. Estas líneas celulares se cultivaron en DMEM (Dubelcco's modified Eagle's medium) suplementado con un 5% de suero bovino fetal. El medio de cultivo contenía penicilina (100 unidades/ml) y estreptomycin (0.1 mg/ml). Las células se incubaron a 37°C en una atmósfera al 5% de CO₂. La contaminación por micoplasmas fue descartada empleando Hoescht 33528.

3.2. Ensayo colorimétrico de citotoxicidad

El ensayo colorimétrico de citotoxicidad (ECC) para la determinación de la capacidad antiproliferativa de los dos compuestos estudiados (estradiol y tamoxifeno) se llevó a cabo tripsinizando los cultivos y diluyéndolos para obtener 4×10^4 células/ml. Las células se encontraban en fase de crecimiento exponencial durante todo el experimento. En placas de cultivo de 24 pocillos (Nunc), se pipetearon alícuotas de 1 ml de células y se incubaron las placas durante 24 horas. Soluciones madre en dimetil sulfóxido (DMSO) de ambos compuestos (estradiol y tamoxifeno) se añadieron a los pocillos en un volumen final de 1 ml por pocillo en medio de cultivo, para obtener un rango de concentraciones de 0.01-10 : M, por cuadruplicado. Tras tres días de incubación, se eliminó el medio de los cultivos, se lavó con tampón fosfato salino (PBS) y se fijó con ácido tricloroacético (TCA) al 10% durante 30 minutos a 4 °C. Posteriormente se lavó con agua corriente para eliminar el TCA. Se dejaron secar las placas y las células así fijadas se tiñeron durante 20 minutos con sulforrodamina B (SRB; Sigma) al 0.4% en ácido acético al 1%. Tras finalizar el periodo de tinción, la SRB se eliminó y se lavaron los cultivos con ácido acético al 1% para eliminar el colorante no unido. Se dejaron secar las placas, y el colorante unido se solubiliza con tampón Tris 10 mM, pH 10.5 y se mide la densidad óptica en un lector de placas (ThermoLabsystems multiscan Ascent) a 492 nm de longitud de onda. La respuesta fotométrica fue lineal con respecto a la concentración de colorante y proporcional al número de células, contadas en paralelo con un hemocitómetro.

3.3. Determinación de la actividad específica pirrolidón carboxipeptidasa

La actividad Pcp fue determinada, mediante un método fluorimétrico, frente al sustrato L-piroglutamil-~~S~~naftilamida (pGluNNap). Así, para determinar el efecto de los dos compuestos estudiados (estradiol y tamoxifeno), se tripsinizaron los cultivos y se diluyeron para obtener 4×10^4 células/ml. Las células se encontraban en fase de crecimiento exponencial durante todo el experimento. En placas de cultivo de 24 pocillos (Nunc), se pipetearon alícuotas de 1 ml de células y se incubaron las placas durante 24 horas. Soluciones madre en dimetil sulfóxido (DMSO) de ambos compuestos (estradiol y tamoxifeno) se añadieron a los pocillos en un volumen final de 1 ml por pocillo en medio de cultivo, para obtener un rango de concentraciones de 0.01-10 : M, por cuadruplicado. Tras tres días de incubación, se eliminó el medio de los cultivos y se lavó con PBS. Posteriormente, a cada pocillo de la placa de cultivo se le añaden 250 : l de medio de cultivo sin suero bovino fetal, conteniendo pGluNNap 100 : M. Tras incubar durante 30 minutos a 37 °C, se para

la reacción añadiendo 250 : L de tampón acetato 0.1 M pH 4.2. La fluorescencia de la β -naftilamina liberada como resultado de la actividad enzimática se determinó utilizando una longitud de onda de excitación de 345 nm y una longitud de onda de emisión de 412 nm. La actividad enzimática específica Pcp se expresa en nanomoles de sustrato hidrolizado por minuto y por 10^5 células, utilizando una curva estándar de β -naftilamina determinada en las mismas condiciones. La respuesta fluorimétrica fue lineal con respecto al tiempo de hidrólisis y el número de células.

3.4. Análisis estadístico

Para analizar las diferencias entre grupos, se ha utilizado un análisis de la varianza de una vía (ANOVA), seguido del test de rango múltiple de Newman-Keuls. Todas las comparaciones con valores de $p < 0.05$ se consideraron significativas.

4. RESULTADOS

La figura 3 muestra las curvas de inhibición del crecimiento para las líneas celulares hormono-dependiente y hormono-independiente MCF-7 y EVSA-T, determinadas mediante el ensayo colorimétrico de citotoxicidad, tras el tratamiento con estradiol y tamoxifeno. Se observa como el tratamiento con estradiol, a ninguna de las concentraciones utilizadas, modifica las curvas de crecimiento en ninguna de las dos líneas celulares (figura 3A). Sin embargo, el tamoxifeno, aunque solo a la mayor concentración utilizada (10 : M), inhibe significativamente ($p < 0.01$) las curvas de crecimiento de ambas líneas celulares MCF-7 y EVSA-T (figura 3B).

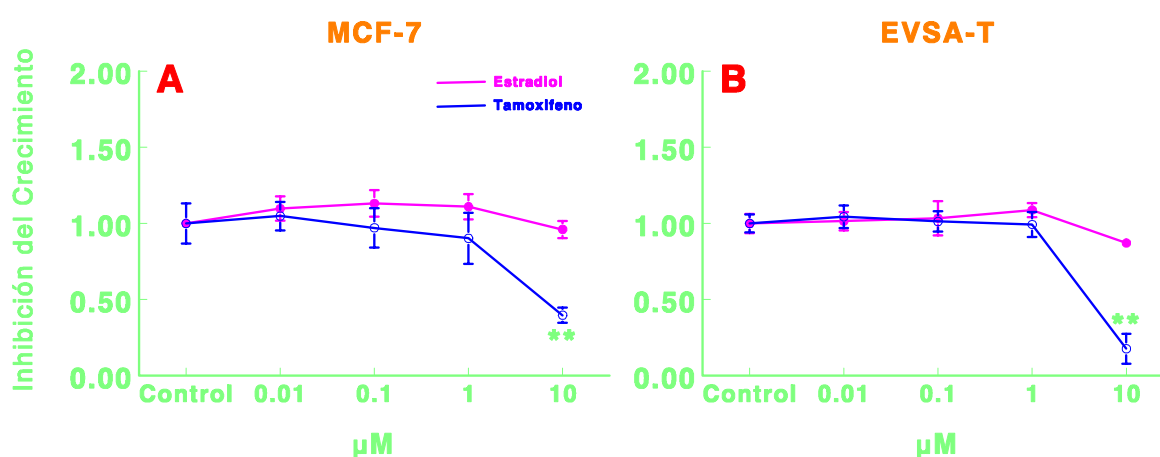


Figura 3. Curvas de inhibición del crecimiento celular para las líneas celulares de cáncer de mama humano hormono-dependiente MCF-7 y hormono-independiente EVSA-T, analizadas por el ensayo colorimétrico de citotoxicidad, tras el tratamiento con estradiol y tamoxifeno (Media \pm EEM; $n=4$; ** $p < 0.01$).

La figura 4 muestra la actividad específica Pcp en las líneas celulares hormono-dependiente MCF-7 y hormono-independiente EVSA-T, tras el tratamiento con estradiol y tamoxifeno. Por lo que respecta a las células MCF-7, el tratamiento con estradiol disminuye la actividad Pcp de forma significativa ($p < 0.05$ para las concentraciones 0.1 y 1 : M y $p < 0.01$ para la concentración 10 : M). Sin embargo, cuando las células MCF-7 son tratadas con tamoxifeno, la actividad específica Pcp no se modifica para ninguna de las concentraciones utilizadas (figura 4A). Por el contrario, el tratamiento de las células EVSA-T con estradiol no modifica la actividad específica Pcp a ninguna de las concentraciones utilizadas, mientras que el tratamiento con tamoxifeno disminuye significativamente ($p < 0.01$) la actividad específica Pcp a partir de una concentración 0.1 : M (figura 4B).

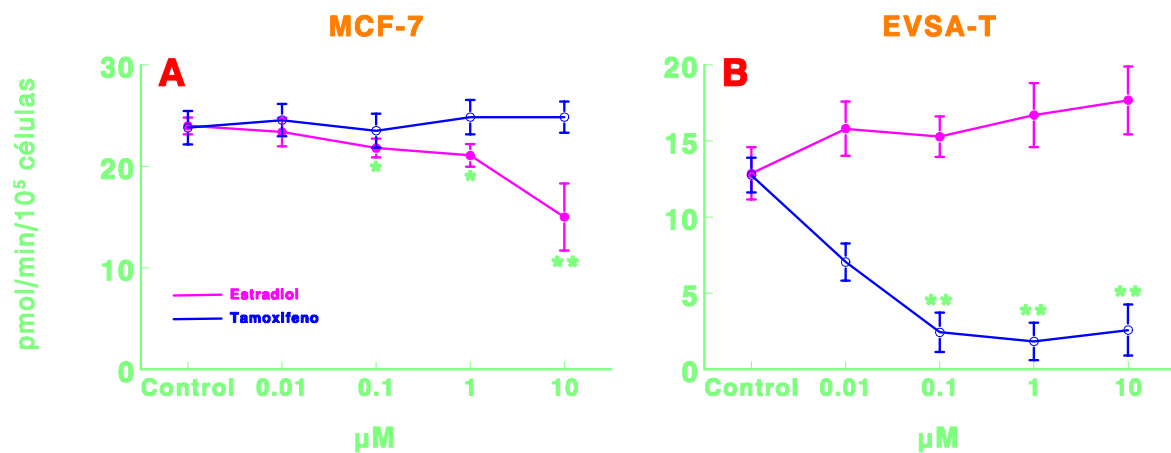


Figura 4. Niveles de actividad específica pirrolidón carboxipeptidasa (Pcp) en las líneas celulares de cáncer de mama humano hormono-dependiente MCF-7 y hormono-independiente EVSA-T tras el tratamiento con estradiol y tamoxifeno (Media ± EEM; n=4; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

5. DISCUSIÓN

Trabajos previos llevados a cabo en cáncer de mama humano, han descrito una disminución significativa de la actividad específica Pcp en tejidos neoplásicos y adyacentes, cuando se compara con la actividad específica Pcp de tejidos no afectados, lo que indicaría que ciertos factores locales pueden ser selectivamente modificados por el proceso tumoral en el tejido afectado (Martínez et al., 1999a). También, en cáncer de mama inducido en ratas mediante N-metil nitrosourea, se ha descrito una disminución de la actividad Pcp en suero, lo que sugiere que esta actividad enzimática está implicada en la patogénesis del cáncer. Puesto que uno de los sustratos sobre los que actúa la Pcp es la GnRH, los resultados de este

estudio indicarían que la regulación de los niveles de esta hormona peptídica a través de su enzima proteolítico regulador podría ser un factor clave en el desarrollo de la enfermedad. En relación con esto, se han encontrado receptores y ARNm de GnRH en tejido mamario, lo que sugiere un papel fisiológico local para la GnRH en la glándula mamaria (Kottler et al., 1997). De hecho, el receptor de GnRH (GnRH-R) había sido inmunolocalizado en el citoplasma de células de carcinoma y también fue detectado de forma limitada en el citoplasma de células morfológicamente normales del epitelio glandular adyacentes al carcinoma. Este estudio indica que el GnRH-R está ampliamente distribuido en las células de carcinoma de mama y que regula localmente las acciones de la GnRH (Moriya et al., 2001). Aunque el GnRH-R había sido encontrado tanto en tejidos normales como en cancerígenos, la prevalencia de GnRH-R era mayor en tejidos tumorales que en no tumorales (Paradiso et al., 2000). Todos estos resultados indican que la GnRH probablemente es un factor local importante que actúa a nivel intracrino, autocrino y/o paracrino en la patogénesis del cáncer de mama y sugieren que está implicada en el proceso tumoral de forma más que importante.

Además, la elevación de los niveles de GnRH está asociada con niveles incrementados de hormonas esteroides gonadales (Huirne and Lambalk, 2001). La transformación de células de mama normales, la iniciación y el mantenimiento del crecimiento del tumor, depende de la interconexión de numerosos factores inhibidores y estimulantes, entre los que destacan los estrógenos (Chiarenza et al., 2001). Los estrógenos estimulan el crecimiento del cáncer de mama aproximadamente en un tercio de los pacientes, mientras que su privación induce una regresión del tumor (Santen et al., 1990). De modo que, el objetivo principal del tratamiento endocrino del cáncer de mama es la inhibición de la actividad estrogénica, bien mediante el bloqueo de los receptores estrogénicos (ER) o bien impidiendo su producción (Gustafsson, 1998; Santen and Harvey, 1999; Brodie and Njar, 2000; Maggiolini et al., 2002). De este modo, la manipulación hormonal juega un papel importante en el tratamiento del cáncer de mama ER-positivo porque no sólo es efectivo, sino que además se asocia con una mínima toxicidad y una excelente calidad de vida (Pritchard, 2003). Uno de los fármacos que se utilizan son los llamados “moduladores ER selectivos” (SERMs). Su mecanismo de acción está basado en que compiten directamente con los estrógenos por su unión al receptor, evitando los mecanismos de señalización intracelular posteriores. El tamoxifeno es un SERMs, con potentes acciones antiestrogénicas, muy usado en el tratamiento del cáncer de mama ER-positivo (Jordan, 1994; Powles and Hickish, 1995; Mckeon, 1999; Nahta et al., 2003), aunque también se utiliza en el tratamiento adyuvante de

otros tumores incluyendo los gliomas malignos (Couldwell et al., 1996; Gelmann, 1997; Heerdt and Borgen, 1999). Se ha demostrado que las altas concentraciones de tamoxifeno inhiben la proliferación celular e inducen apoptosis (Gelmann, 1997). Los resultados del presente estudio apoyan estos datos.

En este trabajo hemos encontrado una disminución de la actividad Pcp en la línea celular de cáncer de mama humano hormono-dependiente MCF-7 cuando se administró estradiol, pero no cuando se administró tamoxifeno. De este modo la administración de estrógenos a estas células hormono-dependientes disminuye la actividad Pcp, intensificando las funciones de la GnRH. Por el contrario, en la línea celular de cáncer de mama humano hormono-independiente EVSA-T, la actividad Pcp no cambió tras el tratamiento con estradiol. Sin embargo, dicha actividad disminuyó con el tratamiento con tamoxifeno. Aunque el mayor efecto bioquímico del tamoxifeno sobre las células de cáncer de mama es la unión competitiva al ER y la inhibición de la expresión de ciertos genes (Rochefort et al., 1984), se han descrito otros muchos efectos como el bloqueo de la división celular en fase G₁, el incremento en la producción de TGF- β , la inhibición de la producción de IGF₁, la disminución de los niveles de IGF1 y el incremento en los niveles de globulina fijadora de hormonas sexuales (Olsen 1998), que podría ser responsable, al menos en parte, de los resultados obtenidos en las células EVSA-T tras el tratamiento con tamoxifeno, sugiriendo que probablemente diversos factores, pero no la GnRH, estén asociados con la patogénesis de los tumores estrógeno-independientes.

6. BIBLIOGRAFÍA.

Behrens BC, Hamilton TC, Masuda H, Grotzinger KR, Whang-Peng J, Louie KG, Knutsen T, McKoy WM, Young RC and Ozols RF: Characterization of a cis-diamminedichloroplatinum(II)-resistant human ovarian cancer cell line and its use in evaluation of platinum analogues. *Cancer Res* 47: 414-418, 1987.

Bernstein L, Ross RK. Endogenous hormones and breast cancer risk. *Epidemiol Rev* 15:48-65, 1993.

Beynon R and Bond J: *Proteolytic Enzymes* New York: Oxford University Press, 2001

Brem SS, Jensen HM, Gullino PM. Angiogenesis as a marker of preneoplastic lesions of the human breast. *Cancer* 41:239-244, 1978.

Brodie AMH and Njar V: Aromatase inhibitors and their application in breast cancer treatment *Steroids* 65: 171-179 , 2000.

Byford JR, Shaw LE, Drew MGB, Pope GS, Sauer MJ, Darbre PD: Oestrogenic activity of parabens in MCF-7 human breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 80: 49-60, 2002.

Cameron DA, Ritchie AA, Miller WR. The relative importance of proliferation and cell death in breast cancer growth and response to tamoxifen. *Eur J Cancer* 37:1545-1553, 2001.

Cameron DA, Keen JC, Dixon JM, Bellamy C, Hanby A, Anderson TJ, Miller WR. Effective tamoxifen therapy of breast cancer involves both antiproliferative and proapoptotic changes. *Eur J Cancer* 36:845-851, 2000.

Carrera MP, Ramirez-Exposito MJ, Valenzuela MT, Garcia MJ, Mayas MD and Martinez-Martos JM: Serum pyrrolidone carboxypeptidase activity in N-methyl nitrosourea induced rat breast cancer. *Horm Metab Res* 35: 502-505, 2003.

Chiarenza A, Lazarovici P, Lempereur L, Cantarella G, Bianchi A and Bernardini R: Tamoxifen inhibits nerve growth factor-induced proliferation of the human breast cancerous cell line MCF-7. *Cancer Res* 61: 3002-3008, 2001.

Colletti RB, Roberts JD, Devlin JT, Copeland KC. Effect of tamoxifen on plasma insulin-like growth factor I in patients with breast cancer. *Cancer Res* 49:1882-1884, 1989.

Couldwell WT, Hinton DR, Surnock AA, DeGeorgio CM, Weiner LP, Apuzzo ML, Masri L, Law RE and Weiss MH: Treatment of recurrent malignant gliomas with chronic oral high-dose tamoxifen. *Clin Cancer Res* 2: 619-622, 1996.

Cummins PM and O'Connor B: Pyroglutamyl peptidase, an overview of the three known enzymatic forms. *Biochim Biophys Acta* 429: 1-17, 1998.

Darbre PD and Daly RJ: Effects of oestrogen on human breast cancer cells in culture. *Proc Royal Soc Edinburgh* 132: 1190-2013, 1989.

del Moral R, Fernandez JC, Lopez-Gonzalez JD, Gomez M, Ruiz de Almodovar JM, Olea N and Pedraza V: Kinetics of cellular proliferation and hormonal receptors in EVSA-T breast cancer cell line. *Rev Esp Fisiol* 47: 25-30, 1991.

Dorland's illustrated medical dictionary. 25th ed. Philadelphia, PA, W.B. Saunders, 1974.

Forbes JF. The control of breast cancer: the role of tamoxifen. *Semin Oncol* 24:S1-5-S1, 1997.

García MJ, Martínez-Martos JM, Mayas MD, Ramírez M and Ramírez-Expósito MJ: Influencia del estradiol sobre la actividad piroglutamato aminopeptidasa en la corteza frontal de ratones ovariectomizados. *Rev Neurol* 33: 425-427, 2001.

Gelmann EP: Tamoxifen for the treatment of malignancies other than breast and endometrial carcinoma. *Semin Oncol* 24: S65-S70, 1997.

González-Palacios JF. Lesiones mamarias preinfiltrantes y riesgo de padecer cáncer de mama. *European School of Oncology* 2003.

Gustafsson JA: Therapeutic potential of selective estrogen receptor modulators. *Curr Opin Chem Biol* 2: 508-511, 1998.

Heerdt AS and Borgen PI. Current status of tamoxifen use: an update for the surgical oncologist. *J Surg Oncol* 72: 42-49, 1999.

Hu YF, Russo IH, Russo J. Prevention of human breast cancer *J Women's Cancer* 25:13-41, 2000.

Huirne JA and Lambalk CB. Gonadotropin- releasing- hormone-receptor antagonists. *Lancet* 358: 1793-1803, 2001.

Imagawa W, Pedchenko VK, Helber J and Zhang H: Hormone/growth factor interactions mediating epithelial/stromal communication in mammary gland development and carcinogenesis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 80: 213-230, 2002.

Jordan VC, Dowse LJ. Tamoxifen as an anti-tumour agent: effect on oestrogen binding. *J Endocrinol* 68:297-303, 1976.

Jordan VC: Long-term tamoxifen treatment for breast cancer. Madison, WI University of Wisconsin Press, 1994

Jordan VC: Laboratory studies to develop general principles for the adjuvant treatment of breast cancer with antiestrogen: Problem and potential for future clinical applications. *Breast Cancer Res Treat* 3: 73-86, 1983.

Kottler ML, Starzec A, Carre MC, Lagarde JP, Martin A and Counis R: The genes for gonadotropin- releasing hormone and its receptor are expressed in human breast with fibrocystic disease and cancer. *Int J Cancer* 71: 595-599, 1997.

Kuukasjarvi T, Karhu R, Tanner M, Kahkonen M, Schaffer A, Nupponen N, Pennanen S, Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Isola J. Genetic heterogeneity and clonal evolution underlying development of asynchronous metastasis in human breast cancer. *Cancer Res* 57:1597-1604, 1997.

Levi LN, Ben-Aroya N, Tel-Or S, Palmon A, Burstein Y, Koch Y. Expression of the gene for the receptor of gonadotropin-releasing hormone in the rat mammary gland. *FEBS Lett* 379:186-190, 1996.

Lu J, Jiang C, Mitrenga T, Cutter G, Thompson HJ. Pathogenic characterization of 1-methyl-1-nitrosourea-induced mammary carcinomas in the rat. *Carcinogenesis* 19:223-227, 1998.

Maggiolini M, Bonofiglio D, Pezzi V, Carpino A, Marsico S, Rago V, Vivacqua A, Picard D and Ando S: Aromatase overexpression enhances the stimulatory effects of adrenal androgens on MCF-7 breast cancer cells. *Mol Cell Endocrinol* 193: 13-18, 2002.

Maiorana A, Gullino PM. Acquisition of angiogenic capacity and neoplastic transformation in the rat mammary gland. *Cancer Res* 38:4409-4414, 1978.

Mantle D, Lauffart B, Gibson A. Purification and characterization of leucyl aminopeptidase and pyroglutamyl aminopeptidase from human skeletal muscle. *Clin Chim Acta* 197:35-45, 1991.

Martínez JM, Ramírez MJ, Prieto I, Alba F and Ramírez M: Sex differences and in vitro effects of steroids on serum aminopeptidase activities. *Peptides* 19: 1637-1640, 1998.

Martínez JM, Ramírez MJ, Prieto I, Petzelt C, Hermoso F, Alba F, Arias Saavedra JM and Ramírez M: Human serum pyroglutamyl- β -naphthylamide hydrolyzing activity during development and aging. *Arch Gerontol Geriatr* 28: 31-36, 1999.

Martínez JM, Prieto I, Ramírez MJ, Cueva C, Alba F and Ramírez M: Aminopeptidase activities in breast cancer tissue. *Clin Chem* 45: 1797-1802, 1999.

McKeon VA: The breast cancer prevention trial: should women at risk take tamoxifen? *J Obstet Gynecol Neonatal Nurs* 28: 34-38, 1999.

Mettlin C. Global breast cancer mortality statistics. *CA Cancer J Clin* 49:138-144, 1999.

Miller BA, Feuer EJ, Hankey BF. The increasing incidence of breast cancer since 1982: relevance of early detection. *Cancer Causes Control* 2:67-74, 1991.

Moriya T, Suzuki T, Pilichowska M, Ariga N, Kimura N, Ouchi N, Nagura H and

Sasanu H: Immunohistochemical expression of gonadotropin releasing hormone receptor in human breast carcinoma. *Pathol Int* 51: 333-337, 2001.

Nahta R, Hortobagyi GN and Esteva FJ. Novel pharmacological approaches in the treatment of breast cancer. *Expert Opin Investig Drugs* 12: 909-917, 2003.

Newcombe PA and Lantz PM: Recent trends in breast cancer incidence, mortality and mammography. *Breast Cancer Res Treat* 28: 97-106, 1993.

O'Higgins N. Aspects of breast cancers. *Chirurgie* 118:324-327, 1992.

Olsen MR and Love RR: Hormonal strategies for the prevention of breast cancer. In: Foon KA and Muss HB (Eds). *Biological and hormonal therapies of cancer* Kluwer Academic Publishers, Boston 1998.

Osborne CK, Boldt DH, Clark GM, Trent JM. Effects of tamoxifen on human breast cancer cell cycle kinetics: accumulation of cells in early G1 phase. *Cancer Res* 43:3583-3585, 1983.

Page DL, Dupont WD, Rogers LW, Rados MS. Atypical hyperplastic lesions of the female breast. A long-term follow-up study. *Cancer* 55:2698-2708, 1985.

Paradiso A, Pezzetta A, Cellamare G, Shittulli F, Marzullo F and Reskin SJ: GnRH receptors in human breast cancer and its contiguous not-involved breast tissue. *J Endocrinol Invest* 23: 90-96, 2000.

Pike MC, Spicer DV, Dahmouch L, Press MF. Estrogens, progestogens, normal breast cell proliferation, and breast cancer risk. *Epidemiol Rev* 15:17-35, 1993.

Powles TJ, Hickish T: Tamoxifen therapy and carcinogenic risk. *J Natl Cancer Inst* 87: 1343-1345, 1995.

Pritchard KI: Endocrine Therapy of advanced disease: analysis and implications of the existing data. *Clin Cancer Res* 9: 4605-4675, 2003.

Ramírez-Expósito MJ, García MJ, Mayas MD, Ramírez M and Martínez-Martos JM: El colesterol de la dieta modifica la actividad piroglutamil aminopeptidasa de la corteza frontal del ratón. *Diferencias sexuales Rev Neurol* 32: 904-907, 2001.

Rocheffort H, Bardon S, Chalbos D, Vignon F: Steroidal and nonsteroidal antiestrogens in breast cancer cells in culture. *J Steroid Biochem* 20: 105-110, 1984.

Rose DP, Pruitt B, Stauber P, Erturk E, Bryan GT. Influence of dosage schedule on the biological characteristics of N-nitrosomethylurea-induced rat mammary tumors. *Cancer Res* 40:235-239, 1980.

Rubinstein LV, Shoemaker RH, Paull KD, Simon RM, Tosini S, Skehan P, Scudiero DA, Monks A and Boyd MR: Comparison of in vitro anticancer-drug-screening data generated with a tetrazolium assay versus a protein assay against a diverse panel of human tumor cell lines. *J Natl Cancer Inst* 82: 1113-1118, 1990.

Ruiz de Almodovar JM, Nuñez MI, McMillan TJ, Olea N, Mort C, Villalobos M, Pedraza V and Steel GG: Initial radiation-induced DNA damage in human tumour cell lines: a correlation with intrinsic cellular radiosensitivity. *Br J Cancer* 69: 457-462, 1994.

Russo J, Calaf G, Russo IH. A critical approach to the malignant transformation of human breast epithelial cells with chemical carcinogens. *Crit Rev Oncog* 4:403-417, 1993.

Russo IH, Russo J. Role of hormones in mammary cancer initiation and progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 3:49-61, 1998.

Russo J, Gusterson BA, Rogers AE, Russo IH, Wellings SR, van Zwieten MJ. Comparative study of human and rat mammary tumorigenesis. *Lab Invest* 62:244-278, 1990.

Russo J, Hu YF, Silva ID, Russo IH. Cancer risk related to mammary gland structure and development. *Microsc Res Tech* 52:204-223, 2001.

Russo J, Russo IH. Biological and molecular bases of mammary carcinogenesis. *Lab Invest* 57:112-137, 1987.

Russo J, Hu YF, Yang X, Russo IH. Developmental, cellular, and molecular basis of human breast cancer. *J Natl Cancer Inst Monogr* 17-37, 2000.

Russo IH, Russo J. Mammary gland neoplasia in long-term rodent studies. *Environ Health Perspect* 104:938-967, 1996.

Santen RJ and Harvey H: Use of aromatase inhibitors in breast carcinoma. *Endocr Related Cancer* 6: 75-92, 1999.

Santen RJ, Manni A, Harvey H and Redmond C: Endocrine treatment of breast cancer in women. *Endocr Rev* 11: 1-45, 1990.

Schomburg L, Bauer K. Thyroid hormones rapidly and stringently regulate the messenger RNA levels of the thyrotropin-releasing hormone (TRH) receptor and the TRH-degrading ectoenzyme. *Endocrinology* 136:3480-3485, 1995.

Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D, Warren JT, Bokesch H, Kenney S and Boyd MR: New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J Natl Cancer Inst* 82: 1107-1112, 1990.

Valenzuela MT, Núñez MI, Villalobos M, Siles E, Olea N, Pedraza V, McMillan TJ and Ruíz de Almodóvar JM: Relationship between doxorubicin cell sensitivity, drug-induced DNA double-strand breaks, glutathione content and P-glycoprotein in mammalian tumor cells. *Anti-Cancer Drugs* 6: 749-757, 1995.

Villalobos M, Becerra D, Nuñez MI, Valenzuela MT, Siles E, Olea N, Pedraza V and Ruiz de Almodovar JM: Radiosensitivity of human breast cancer cell lines of different hormonal responsiveness. Modulatory effects of oestradiol. *Int J Radiat Biol* 70: 161-169, 1996.

Wilk S. Inhibitors of TRH-degrading enzymes. *Ann N Y Acad Sci* 553:252-264, 1989.

Yao K, Jordan VC. Questions about Tamoxifen and the Future Use of Antiestrogens. *Oncologist* 3:104-110, 1998.

Zajchowski D, Sajer R and Webster L: Estrogen inhibits the growth of estrogen receptor- negative, but not estrogen receptor- positive, human mammary epithelial cells expressing a recombinant estrogen receptor. *Cancer Res* 53: 5004-5011, 1993.

.oOo.



**Área de Fisiología
Departamento de Ciencias de la Salud
Facultad de Ciencias Experimentales y de la Salud
Universidad de Jaén**

**ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ESPECÍFICA PIRROLIDÓN
CARBOXIPEPTIDASA (PCP) EN LAS LÍNEAS CELULARES DE
CÁNCER DE MAMA HUMANO ESTRÓGENO-DEPENDIENTE Y
ESTRÓGENO-INDEPENDIENTE MCF-7 Y EVSA-T Y SU
RESPUESTA AL ESTRADIOL Y EL TAMOXIFENO**

**Belén Oya Álvarez de Morales
Trabajo de Investigación Tutelado
Jaén, 2005**

1. INTRODUCCIÓN

1.1. EL CÁNCER DE MAMA

El cáncer de mama es una enfermedad conocida desde el Antiguo Egipto. Un papiro datado entre los años 1600-1500 a.C. refleja, probablemente, la primera cita de un carcinoma mamario de la historia. Por tanto nos encontramos ante una antigua enfermedad, que ha llegado a ser la enfermedad maligna más común causante de muerte entre las mujeres de la Comunidad Europea, incrementándose en los países del Este (O'Higgins, 1992; Miller *et al.*, 1982).

En los años 80 se modificaron conceptos relacionados con el tratamiento quirúrgico y la curación del cáncer de mama, gracias al conocimiento de la biología molecular del inicio y progresión del cáncer así como de la interacción tumor-paciente: se demostraba que el perfil hormonal paracrina y autocrina de la mama en el momento de la extirpación del cáncer modulaba el curso posterior de la enfermedad. Se llegó así a la conclusión de que los mismos factores que eran responsables de la proliferación del tejido mamario normal durante la pubertad y de los cambios cíclicos del ciclo menstrual, están implicados en la promoción, progresión y aparición del cáncer de mama (Forbes, 1997).

El fracaso en la erradicación de esta enfermedad se debe, fundamentalmente, a la dificultad de identificar a un agente etiológico específico, de precisar el momento de inicio y de conocer los mecanismos moleculares responsables del inicio y progresión del cáncer. A pesar de los numerosos desaciertos en torno al origen del cáncer, existen evidencias de que el riesgo de cáncer de mama está relacionado con factores endocrinológicos y reproductivos. Por otro lado, estudios genéticos, epidemiológicos y clínicos han identificado una serie de parámetros biológicos y sociales como factores de riesgo asociados al cáncer de mama. Algunos de ellos serían la evidencia de genes susceptibles, como BRCA1 y BRCA2, la historia familiar de cáncer de mama, ovario o endometrio, la historia individual de desórdenes mamarios, edad avanzada, estatus socioeconómico alto, exceso en la exposición a radiaciones ionizantes o consumo de alcohol (Mettlin, 1999; Pike *et al.*, 1993; Bernstein y Ross, 1993; Hu *et al.*, 2000).

La glándula mamaria es, de hecho, la localización más frecuente de tumores y/o neoplasmas. El término tumor y neoplasma son aplicados indistintamente a lesiones malignas y benignas porque el término tumor (del latín *tumere*) significa cualquier aumento patológico o nuevo crecimiento, como neoplasma (del griego *neos*, nuevo y *plasma*, formación) (Dorland, 1974).

Los tumores benignos son aquellos que no invaden tejidos adyacentes, no se metastatizan a órganos distantes y pueden ser eliminados por extirpación local.

Suelen crecer de forma lenta a lo largo de los años, formando masas cohesivas que permanecen localizadas en su lugar de origen, siendo el fibroadenoma (lesión bien delimitada, de consistencia elástica, que contiene tanto elementos epiteliales como fibrosos) el mas frecuente en la mama femenina. Los tumores malignos, son neoplasmas caracterizados por su habilidad para invadir, metastizarse y en último término, causar la muerte del hospedador, siendo el carcinoma ductal infiltrante el tipo histológico de cáncer de mama más frecuente (65-80 %) (Russo y Russo, 1996a).

La malignidad o benignidad tumoral, ya sean tumores inducidos mediante un carcinógeno o generados de forma espontánea e puede determinar por criterios derivados de un examen macroscópico, histopatológico y analizando el comportamiento biológico del tumor. Los principales criterios a tener en cuenta en un examen macroscópico, una vez realizado un examen general del tumor, son el índice de crecimiento y la apariencia macroscópica. Normalmente los tumores malignos tienden a tener un crecimiento muy rápido. En cuanto a la apariencia macroscópica, los carcinomas en general son suaves y carnosos, están muy bien vascularizados y tienen zonas de necrosis y hemorragias, e incluso algunos pueden contener sangre y material necrotizado, a diferencia de los fibroadenomas que son blancos, con una consistencia firme y elástica.

Entre los criterios histopatológicos de malignidad, el más importante es la pérdida del modelo tubular-alveolar de la glándula mamaria normal. Citológicamente, las células malignas son más grandes que sus homologas normales y existe un incremento en la proporción nucleocitoplasmática (Russo y Russo, 2000). La heterogeneidad epitelial presente en la glándula mamaria normal o incluso en las lesiones benignas, donde podemos encontrar células mioepiteliales, oscuras, intermedias o claras, raramente se observa en lesiones malignas (Russo *et al.*, 1983). El tipo celular predominante en lesiones malignas es de tipo intermedio, siendo difícil encontrar células oscuras. Por otro lado, el número de mitosis es generalmente mayor en lesiones malignas que en benignas (Russo y Russo, 1987).

En cuanto al criterio biológico de malignidad más fiable, sería la capacidad de un tumor de metastizarse hacia órganos distantes, aunque la habilidad de lesiones neoplásicas para generar angiogénesis ha sido también propuesta para ser un marcador biológico de malignidad, aunque todavía su uso no está muy extendido (Brem *et al.*, 1978; Maiorana y Gullino, 1978).

Se ha sugerido que el desarrollo de metástasis a distancia es una etapa tardía en la progresión de carcinoma mamario, que ocurre por adquisición de alteraciones genéticas que hacen a la célula competente para colonizar y proliferar

en los distintos órganos. No obstante, algunos estudios han planteado una hipótesis alternativa, al encontrar no solo que algunas metástasis no comparten los cambios moleculares de los tumores primarios, sino que además, metástasis en órganos distintos de un mismo primario divergen también en su perfil genético (Kuukasjarvi *et al.*, 1997). Así mismo se indica el carácter específico de los genes implicados en la metástasis en distintos órganos, siendo diferentes los implicados, por ejemplo, en las metástasis óseas frente a las de glándula suprarrenal.

De hecho, el proceso de tumorigénesis mamaria resulta de la progresión de benigno a maligno, donde la acumulación de múltiples cambios genéticos desencadenan la evolución de un epitelio normal mamario a través de lesiones proliferativas benignas, a lesiones proliferativas atípicas, finalizando en carcinomas *in situ* y tumores invasivos.

Es difícil, a la vista de los conocimientos actuales, enumerar lesiones que en sentido estricto puedan considerarse iniciales del cáncer mamario. Desde principios del siglo XIX se conoce que la enfermedad mamaria benigna pueda ser precursora del cáncer y por estudios más recientes, ya históricos, que algunas lesiones, en particular hiperplasias y carcinomas *in situ*, pueden preceder al carcinoma invasivo, existiendo un aparente continuo histológico entre ellos y también una presencia coincidente en la misma mama. Hay mujeres con procesos mamarios, como hiperplasias usuales, hiperplasias atípicas y carcinomas *in situ* que tienen un incremento en el riesgo relativo de padecer cáncer (Page *et al.*, 1985).

El dogma biológico del cáncer parece cumplirse también en la mama, considerándose que un cáncer invasivo está precedido por una serie de pasos intermedios. En un sentido general y quizás inapropiado, algunas de estas etapas, especialmente las que conllevan mayor riesgo de cáncer invasivo se consideran lesiones iniciales del carcinoma. Otras, como el carcinoma ductal *in situ*, además tienen algún rasgo fenotípico de malignidad, pero carecen de la habilidad de invadir y metastizar, por lo que en este sentido son lesiones premalignas, preinvasivas o precursoras (González-Palacios, 2003).

1.2. LA ACTIVIDAD PIRROLIDÓN CARBOXIPEPTIDASA.

La pirrolidón carboxipeptidasa (Pcp), también conocida como piroglutamil aminopeptidasa es una omega-peptidasa que hidroliza residuos piroglutamil terminales de péptidos, proteínas y derivados de arilamidas de manera altamente selectiva, jugando un papel fisiológico en la regulación de la circulación de péptidos biológicamente activos como la hormona liberadora de tirotrópina (TRH) y la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH). Sin embargo, aunque su acción

hidrolítica sobre péptidos y sustratos artificiales ha sido ampliamente estudiada, el papel fisiológico de esta enzima y su mecanismo de regulación no son bien conocidos. Otros estudios han sugerido la influencia de esteroides gonadales sobre esta actividad en suero, existiendo la posibilidad de que estas sustancias ayuden a crear un ambiente bioquímico que regule, al menos en parte, la actividad de estas enzimas.

Existen dos actividades específicas y diferenciadas de la pirrolidón carboxipeptidasa según la localización, la actividad pirrolidón carboxipeptidasa I, localizada a nivel citosólico, y la actividad pirrolidón carboxipeptidasa II, localizada a nivel de membrana (también llamadas piroglutamato aminopeptidasas I y II, Pcp I y Pcp II, respectivamente). También se ha descrito esta actividad a nivel del suero, donde se le denomina tiro liberinasa (Cummins y O'Connor, 1998).

1.2.1. Pirrolidón Carboxipeptidasa I

- *Clasificación de peptidasas*: Clan CF, familia C15, MEROPS ID: C15.010

- *Clasificación enzimática del NC-IUBMB*: E.C. 3.4.19.3.

Acción. Libera un grupo piroglutámico N-terminal de péptidos y proteínas, no siendo el segundo aminoácido Pro, además de aminoacil-~~S~~naftilamidas, aminoacil-metilcumarinas y aminoacil-~~D~~nitroanilidas.

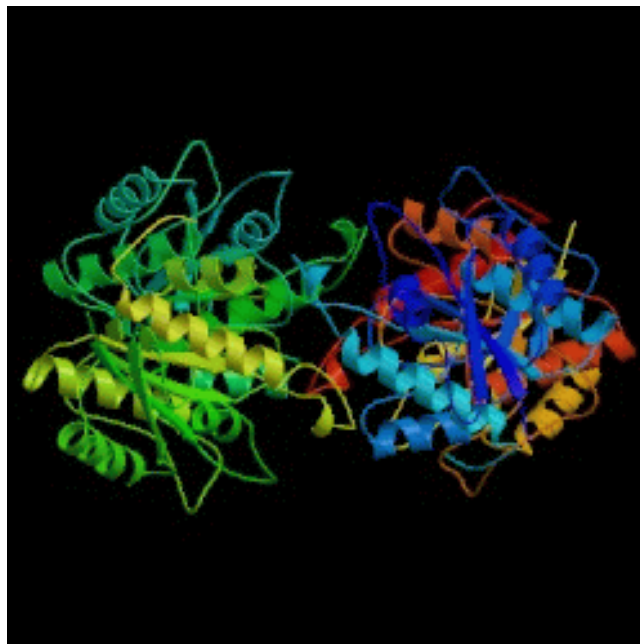


Figura 1. Estructura tridimensional propuesta para la enzima pirrolidón carboxipeptidasa I.

Sustrato artificial. pGlu- $\$$ naftilamida

Propiedades

moleculares. Cistein-peptidasa monomérica de 24 KDa y pH óptimo entre 6.5-8.5. es un enzima sulfidril-dependiente, mostrando un requerimiento estricto de agentes como el DTT o 2-mercaptoetanol (2-ME). Se inhibe por iodoacetamida y otros agentes bloqueantes de grupos sulfidrilos. También es muy sensible a trazas de metales pesados. Tiene dos residuos de Cys, uno de los cuales está implicado en su actividad catalítica (*Figura 1.*).

Distribución. Exopeptidasa ampliamente distribuida por diferentes especies y tejidos a nivel citosólico, tales como músculo esquelético, cerebro y riñón.

Aspectos

biológicos. Capaz de liberar residuos piroglutámicos N-terminales de péptidos biológicamente activos, incluyendo TRH, GnRH, neurotensina y bombesina. Aunque su papel no está claro todavía, puede contribuir al catabolismo intracelular de péptidos hacia aminoácidos libres, los cuales pueden ser reincorporados a rutas biosintéticas (Mantle *et al.*, 1991).

1.2.2. Pirrolidón carboxipeptidasa II

- *Clasificación de peptidasas:* Clan MA, familia M1, MEROPS ID: M01.008

- *Clasificación enzimática del NC-UlBMB:* E.C. 3.4.19.6.

Acción. Libera el grupo piroglutámico N-terminal de tripéptidos pGlu-His-X y tetrapéptidos pGlu-His-X-Gly, con estrecha especificidad por sustratos como la TRH, además de el Glu del Glu-His-Pro- $\$$ naftilamidas.

Sustrato artificial. pGlu- $\$$ naftilamida

Propiedades

moleculares. Metalopeptidasa glicosilada, zinc-dependiente de alto peso molecular, 230 KDa, formada por dos subunidades. Se inhibe por 1,10-fenantrolina y agentes quelantes como el EDTA. PH óptimo de 7.3.

Distribución. Ectoenzima localizada concretamente como proteína integral de membrana en la superficie de células neuronales (no células gliales), aunque también se encuentra en todo el SNC, retina, pulmón y otros tejidos.

Aspectos

biológicos. La alta especificidad por su sustrato TRH o análogos de TRH (Wilk, 1989). Está regulada por hormonas tiroideas (Schomburg y Bauer, 1995) y estrógenos (Cummins y O'Connor, 1998) de forma específica de tejido.

1.2.3. La actividad pirrolidón carboxipeptidasa y el cáncer de mama

Si bien se sabe que la participación hormonal tanto en el desarrollo normal como de carcinomas en la mama es fundamental, es más limitado el conocimiento que se tiene de algunos enzimas reguladores de hormonas peptídicas, como es el caso de la Pcp. Se han llevado a cabo algunos estudios tanto en modelos animales (inducidos por N-metil-nitrosourea -NMU-) como en humanos. La inducción de tumores mediante NMU se caracteriza por inducir tumores estrógeno dependientes (Rose *et al.*, 1980), siendo uno de sus principales atributos que la proporción de carcinomas mamarios que son ovario-dependientes es similar a la observada en la enfermedad en humanos (Luet *et al.*, 1998). La dependencia estrogénica de dichos tumores inducidos mediante NMU podría relacionarse con la disminución observada en la actividad Pcp en el suero de estos animales. Trabajos previos mostraron cambios en la actividad Pcp en cáncer de mama en mujeres, a nivel de tejido tumoral y adyacente, confirmándose que cambios en esta enzima o en sus posibles sustratos pueden tener un importante papel en la patogénesis del cáncer de mama (Martínez *et al.*, 1999).

Ya que uno de los sustratos susceptibles de la Pcp es la GnRH, la disminución observada en su actividad indicaría la existencia de altos niveles circulantes de esta hormona peptídica. En este sentido, se han localizado en tejido mamario receptores para GnRH (GnRH-R), sugiriéndose un papel local de la GnRH

en la glándula mamaria humana (Kottler *et al.*, 1997). También han sido inmunolocalizados GnRH-R en el citoplasma de células tumorales e incluso en el citoplasma de células morfológicamente normales del epitelio glandular adyacente al carcinoma. Aunque se han encontrado GnRH-R tanto en tejido normal como en tumoral, la presencia de GnRH-R fue superior en tejido tumoral que en el no tumoral (Paradiso *et al.*, 2000). De cualquier forma el aumento en los niveles de GnRH conduce a un incremento en los niveles de hormonas esteroideas gonadales (Huirne y Lambalk, 2001) como el estradiol, que estimula tanto la actividad mitótica como el crecimiento del tejido epitelial mamario, conduciendo a un aumento de la sensibilidad al carcinógeno. Por tanto la disminución de la actividad Pcp, nos podría hacer suponer un aumento de los niveles de GnRH, lo que se traduce en un aumento en la producción de hormonas esteroideas gonadales, responsables, al menos en parte del inicio y desarrollo de esta enfermedad.

Como hemos comentado, el riesgo de cáncer de mama, esta fuertemente influenciado por parámetros endocrinos y reproductivos (Russo *et al.*, 2001).

El aumento en los niveles de GnRH supondría un aumento en los niveles de esteroides sexuales. De hecho, se han localizado receptores, tanto para estradiol y progesterona como para prolactina y el factor de crecimiento epitelial (EGF, del inglés Epithelial Growth Factor) en tumores desarrollados en rata siguiendo este mismo modelo. La localización de receptores para estrógenos en el total de los tumores, sugiere una sensibilidad uniforme a la manipulación hormonal, es decir, hormono dependencia. En humanos, el hecho de que las células proliferantes sean distintas de aquellas que son positivas para ER y PgR, apoyan los datos que indican que los estrógenos controlan la proliferación celular por mecanismos indirectos.

En este sentido, la actividad proliferativa y el mayor porcentaje de células positivas para ER y PgR se encuentra en las estructuras lobulares tipo1. Hecho que justifica el que estas estructuras sean las que tienen un mayor grado de susceptibilidad para ser transformadas por carcinógenos *in vitro* (Russo *et al.*, 1998; Russo *et al.*, 1993), apoyando igualmente las observaciones de que las estructuras Lob 1 son el origen de carcinomas ductales (Russo *et al.*, 1990).

Sin embargo, también se ha descrito tanto en la glándula mamaria de rata como en humanos, ARNm tanto para GnRH como para receptores de GnRH. Este péptido puede actuar de forma autocrina o paracrina, aunque, en el caso de la rata esta expresión solo ha sido detectada en ratas gestantes o lactantes, pero no en ratas vírgenes (Levi *et al.*, 1996).

En el modelo animal de cáncer de mama, la actividad específica Pcp en la propia mama mostró un incremento significativo en su actividad soluble (Pcp I) y

unida a membrana (Pcp II) que podría ser consecuencia de los altos niveles circulantes de GnRH, regulando de este modo su función autocrina / paracrina a nivel de la mama. En este sentido, estudios llevados a cabo en nuestro laboratorio muestran un descenso notable de la actividad Pcp II en tejido adyacente y neoplásico de pacientes con cáncer de mama, si bien la actividad Pcp soluble no muestra ningún cambio. Las diferencias en el comportamiento de dicha actividad en glándula mamaria, sugiere que modificaciones en esta enzima o en su sustrato juegan un importante papel en el cáncer de mama aunque queda por delimitar exactamente el mecanismo de acción (Martínez *et al.*, 1999).

En este sentido, el hecho de que no existan diferencias en la expresión del ARNm del receptor de GnRH entre ratas vírgenes, gestantes y lactantes, implica que la activación de los receptores de GnRH en glándula mamaria está regulada por la disponibilidad de GnRH (Levi *et al.*, 1996). Estos datos apoyarían los resultados obtenidos para la actividad Pcp en este modelo. Como también se ha descrito, la actividad Pcp hipotalámica, que no está sujeta a una regulación por estrógenos u otras hormonas, también disminuye significativamente, favoreciendo el incremento de los niveles circulantes de GnRH. A modo de resumen podemos indicar que los cambios en la actividad Pcp en el tejido tumoral supone una respuesta a niveles potencialmente elevados de GnRH, que pueden modificar la función autocrina / paracrina de esta hormona a nivel de la mama (*Figura 2.*).



Figura 2. Posible relación de las actividades Pcp hipotalámica, sérica y mamaria en la determinación de los niveles de GnRH en glándula mamaria.

2. PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS

El cáncer de mama es la causa de muerte más común producida por tumores entre las mujeres del mundo desarrollado. Los mecanismos de regulación hormonal del crecimiento del tumor han sido descritos para los tumores de mama, las líneas celulares y los tumores inducidos experimentalmente. La enzima pirrolidón carboxipeptidasa (Pcp) está modificada en cáncer de mama humano en cáncer de mama de rata, en un modelo inducido por N-metil-nitrosourea, lo que indica que esta actividad participa en la patogénesis del cáncer de mama. Puesto que diversos estudios demuestran, además, la influencia de las hormonas sexuales sobre la actividad Pcp tanto en humanos como en roedores (Martínez et al., 1998; 1999b; Ramírez-Expósito et al., 2001; García et al., 2001) el objetivo de este trabajo es analizar la respuesta de la actividad Pcp, tras la incubación con estradiol y tamoxifeno, en las líneas celulares de cáncer de mama humano estrógeno-dependiente MCF-7 (Darbre y Dali, 1989; Byford et al., 2002) y estrógeno-independiente EVSA-T (Villalobos et al., 1996; del Moral et al., 1991). El tamoxifeno es un modulador selectivo de los receptores de estrógenos, que inhibe de forma competitiva la unión del estradiol a sus receptores (Jordan y Dowse, 1976). Mediante este mecanismo, interfiere en diversos mecanismos celulares implicados en la regulación de la división celular. Las interferencias causadas por el tamoxifeno modifica el perfil de factores de crecimiento en los tejidos diana y provoca que las células se detengan en la fase G₁ del ciclo celular (Osborne et al., 1983; Colleti et al., 1989). Esto induce cambios en los mecanismos de proliferación celular del tumor y con ello, muerte celular. El resultado neto obtenido es una respuesta antitumoral del tamoxifeno (Cameron et al., 2000; Cameron et al., 2001) y con ello, un incremento de la supervivencia (Yao y Jordan, 1998).

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Cultivos Celulares

En el presente estudio se han utilizado las líneas celulares humanas de cáncer de mama hormono-dependiente MCF-7 y hormono-independiente EVSA-T. Estas líneas celulares se cultivaron en DMEM (Dubelcco's modified Eagle's medium) suplementado con un 5% de suero bovino fetal. El medio de cultivo contenía penicilina (100 unidades/ml) y estreptomocina (0.1 mg/ml). Las células se incubaron a 37°C en una atmósfera al 5% de CO₂. La contaminación por micoplasmas fue descartada empleando Hoescht 33528.

3.2. Ensayo colorimétrico de citotoxicidad

El ensayo colorimétrico de citotoxicidad (ECC) para la determinación de la capacidad antiproliferativa de los dos compuestos estudiados (estradiol y tamoxifeno) se llevó a cabo tripsinizando los cultivos y diluyéndolos para obtener 4×10^4 células/ml. Las células se encontraban en fase de crecimiento exponencial durante todo el experimento. En placas de cultivo de 24 pocillos (Nunc), se pipetearon alícuotas de 1 ml de células y se incubaron las placas durante 24 horas. Soluciones madre en dimetil sulfóxido (DMSO) de ambos compuestos (estradiol y tamoxifeno) se añadieron a los pocillos en un volumen final de 1 ml por pocillo en medio de cultivo, para obtener un rango de concentraciones de 0.01-10 : M, por cuadruplicado. Tras tres días de incubación, se eliminó el medio de los cultivos, se lavó con tampón fosfato salino (PBS) y se fijó con ácido tricloroacético (TCA) al 10% durante 30 minutos a 4 °C. Posteriormente se lavó con agua corriente para eliminar el TCA. Se dejaron secar las placas y las células así fijadas se tiñeron durante 20 minutos con sulforrodamina B (SRB; Sigma) al 0.4% en ácido acético al 1%. Tras finalizar el periodo de tinción, la SRB se eliminó y se lavaron los cultivos con ácido acético al 1% para eliminar el colorante no unido. Se dejaron secar las placas, y el colorante unido se solubiliza con tampón Tris 10 mM, pH 10.5 y se mide la densidad óptica en un lector de placas (ThermoLabsystems multiscan Ascent) a 492 nm de longitud de onda. La respuesta fotométrica fue lineal con respecto a la concentración de colorante y proporcional al número de células, contadas en paralelo con un hemocitómetro.

3.3. Determinación de la actividad específica pirrolidón carboxipeptidasa

La actividad Pcp fue determinada, mediante un método fluorimétrico, frente al sustrato L-piroglutamil-~~S~~naftilamida (pGluNNap). Así, para determinar el efecto de los dos compuestos estudiados (estradiol y tamoxifeno), se tripsinizaron los cultivos y se diluyeron para obtener 4×10^4 células/ml. Las células se encontraban en fase de crecimiento exponencial durante todo el experimento. En placas de cultivo de 24 pocillos (Nunc), se pipetearon alícuotas de 1 ml de células y se incubaron las placas durante 24 horas. Soluciones madre en dimetil sulfóxido (DMSO) de ambos compuestos (estradiol y tamoxifeno) se añadieron a los pocillos en un volumen final de 1 ml por pocillo en medio de cultivo, para obtener un rango de concentraciones de 0.01-10 : M, por cuadruplicado. Tras tres días de incubación, se eliminó el medio de los cultivos y se lavó con PBS. Posteriormente, a cada pocillo de la placa de cultivo se le añaden 250 : l de medio de cultivo sin suero bovino fetal, conteniendo pGluNNap 100 : M. Tras incubar durante 30 minutos a 37 °C, se para

la reacción añadiendo 250 : L de tampón acetato 0.1 M pH 4.2. La fluorescencia de la β -naftilamina liberada como resultado de la actividad enzimática se determinó utilizando una longitud de onda de excitación de 345 nm y una longitud de onda de emisión de 412 nm. La actividad enzimática específica Pcp se expresa en nanomoles de sustrato hidrolizado por minuto y por 10^5 células, utilizando una curva estándar de β -naftilamina determinada en las mismas condiciones. La respuesta fluorimétrica fue lineal con respecto al tiempo de hidrólisis y el número de células.

3.4. Análisis estadístico

Para analizar las diferencias entre grupos, se ha utilizado un análisis de la varianza de una vía (ANOVA), seguido del test de rango múltiple de Newman-Keuls. Todas las comparaciones con valores de $p < 0.05$ se consideraron significativas.

4. RESULTADOS

La figura 3 muestra las curvas de inhibición del crecimiento para las líneas celulares hormono-dependiente y hormono-independiente MCF-7 y EVSA-T, determinadas mediante el ensayo colorimétrico de citotoxicidad, tras el tratamiento con estradiol y tamoxifeno. Se observa como el tratamiento con estradiol, a ninguna de las concentraciones utilizadas, modifica las curvas de crecimiento en ninguna de las dos líneas celulares (figura 3A). Sin embargo, el tamoxifeno, aunque solo a la mayor concentración utilizada (10 : M), inhibe significativamente ($p < 0.01$) las curvas de crecimiento de ambas líneas celulares MCF-7 y EVSA-T (figura 3B).

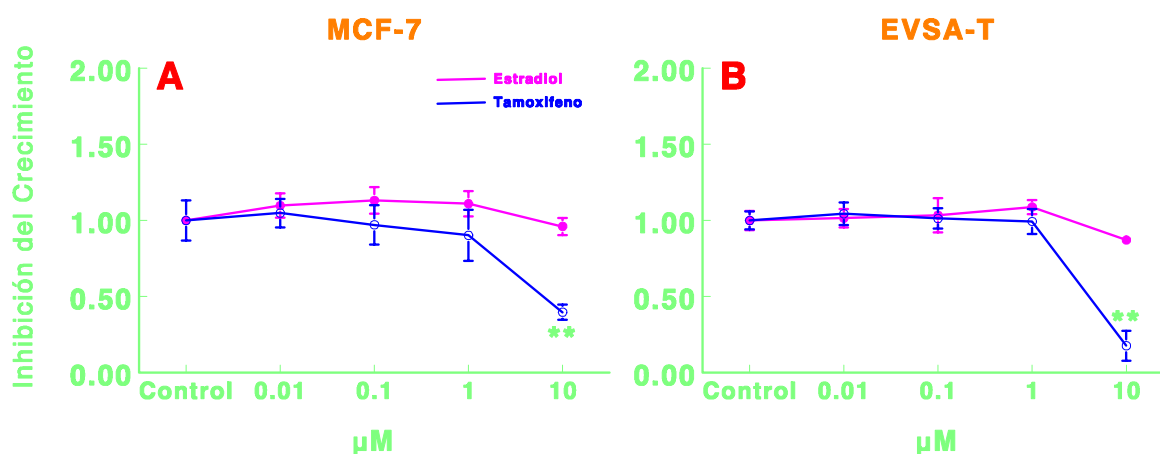


Figura 3. Curvas de inhibición del crecimiento celular para las líneas celulares de cáncer de mama humano hormono-dependiente MCF-7 y hormono-independiente EVSA-T, analizadas por el ensayo colorimétrico de citotoxicidad, tras el tratamiento con estradiol y tamoxifeno (Media \pm EEM; $n=4$; ** $p < 0.01$).

La figura 4 muestra la actividad específica Pcp en las líneas celulares hormono-dependiente MCF-7 y hormono-independiente EVSA-T, tras el tratamiento con estradiol y tamoxifeno. Por lo que respecta a las células MCF-7, el tratamiento con estradiol disminuye la actividad Pcp de forma significativa ($p < 0.05$ para las concentraciones 0.1 y 1 : M y $p < 0.01$ para la concentración 10 : M). Sin embargo, cuando las células MCF-7 son tratadas con tamoxifeno, la actividad específica Pcp no se modifica para ninguna de las concentraciones utilizadas (figura 4A). Por el contrario, el tratamiento de las células EVSA-T con estradiol no modifica la actividad específica Pcp a ninguna de las concentraciones utilizadas, mientras que el tratamiento con tamoxifeno disminuye significativamente ($p < 0.01$) la actividad específica Pcp a partir de una concentración 0.1 : M (figura 4B).

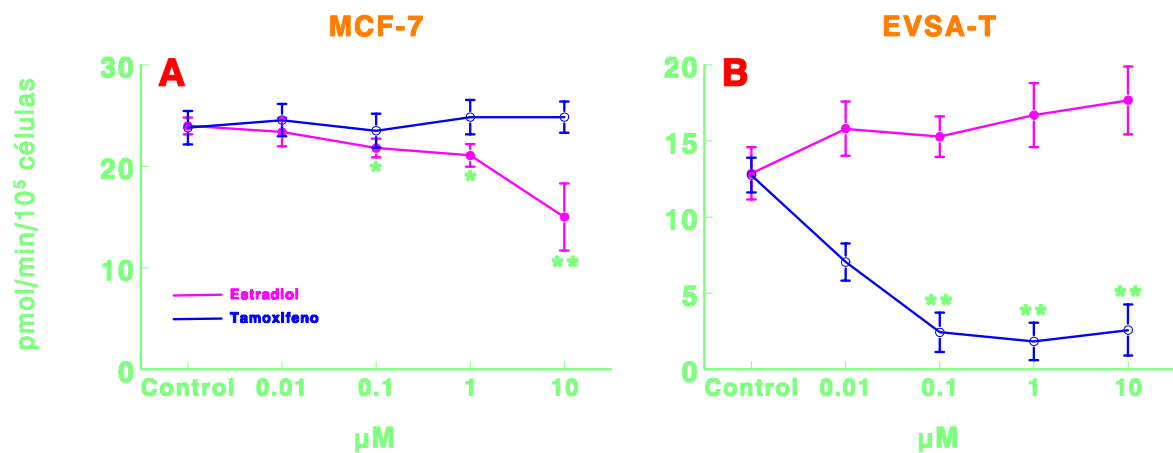


Figura 4. Niveles de actividad específica pirrolidón carboxipeptidasa (Pcp) en las líneas celulares de cáncer de mama humano hormono-dependiente MCF-7 y hormono-independiente EVSA-T tras el tratamiento con estradiol y tamoxifeno (Media ± EEM; n=4; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

5. DISCUSIÓN

Trabajos previos llevados a cabo en cáncer de mama humano, han descrito una disminución significativa de la actividad específica Pcp en tejidos neoplásicos y adyacentes, cuando se compara con la actividad específica Pcp de tejidos no afectados, lo que indicaría que ciertos factores locales pueden ser selectivamente modificados por el proceso tumoral en el tejido afectado (Martínez et al., 1999a). También, en cáncer de mama inducido en ratas mediante N-metil nitrosourea, se ha descrito una disminución de la actividad Pcp en suero, lo que sugiere que esta actividad enzimática está implicada en la patogénesis del cáncer. Puesto que uno de los sustratos sobre los que actúa la Pcp es la GnRH, los resultados de este

estudio indicarían que la regulación de los niveles de esta hormona peptídica a través de su enzima proteolítico regulador podría ser un factor clave en el desarrollo de la enfermedad. En relación con esto, se han encontrado receptores y ARNm de GnRH en tejido mamario, lo que sugiere un papel fisiológico local para la GnRH en la glándula mamaria (Kottler et al., 1997). De hecho, el receptor de GnRH (GnRH-R) había sido inmunolocalizado en el citoplasma de células de carcinoma y también fue detectado de forma limitada en el citoplasma de células morfológicamente normales del epitelio glandular adyacentes al carcinoma. Este estudio indica que el GnRH-R está ampliamente distribuido en las células de carcinoma de mama y que regula localmente las acciones de la GnRH (Moriya et al., 2001). Aunque el GnRH-R había sido encontrado tanto en tejidos normales como en cancerígenos, la prevalencia de GnRH-R era mayor en tejidos tumorales que en no tumorales (Paradiso et al., 2000). Todos estos resultados indican que la GnRH probablemente es un factor local importante que actúa a nivel intracrino, autocrino y/o paracrino en la patogénesis del cáncer de mama y sugieren que está implicada en el proceso tumoral de forma más que importante.

Además, la elevación de los niveles de GnRH está asociada con niveles incrementados de hormonas esteroides gonadales (Huirne and Lambalk, 2001). La transformación de células de mama normales, la iniciación y el mantenimiento del crecimiento del tumor, depende de la interconexión de numerosos factores inhibidores y estimulantes, entre los que destacan los estrógenos (Chiarenza et al., 2001). Los estrógenos estimulan el crecimiento del cáncer de mama aproximadamente en un tercio de los pacientes, mientras que su privación induce una regresión del tumor (Santen et al., 1990). De modo que, el objetivo principal del tratamiento endocrino del cáncer de mama es la inhibición de la actividad estrogénica, bien mediante el bloqueo de los receptores estrogénicos (ER) o bien impidiendo su producción (Gustafsson, 1998; Santen and Harvey, 1999; Brodie and Njar, 2000; Maggiolini et al., 2002). De este modo, la manipulación hormonal juega un papel importante en el tratamiento del cáncer de mama ER-positivo porque no sólo es efectivo, sino que además se asocia con una mínima toxicidad y una excelente calidad de vida (Pritchard, 2003). Uno de los fármacos que se utilizan son los llamados “moduladores ER selectivos” (SERMs). Su mecanismo de acción está basado en que compiten directamente con los estrógenos por su unión al receptor, evitando los mecanismos de señalización intracelular posteriores. El tamoxifeno es un SERMs, con potentes acciones antiestrogénicas, muy usado en el tratamiento del cáncer de mama ER-positivo (Jordan, 1994; Powles and Hickish, 1995; Mckeon, 1999; Nahta et al., 2003), aunque también se utiliza en el tratamiento adyuvante de

otros tumores incluyendo los gliomas malignos (Couldwell et al., 1996; Gelmann, 1997; Heerdt and Borgen, 1999). Se ha demostrado que las altas concentraciones de tamoxifeno inhiben la proliferación celular e inducen apoptosis (Gelmann, 1997). Los resultados del presente estudio apoyan estos datos.

En este trabajo hemos encontrado una disminución de la actividad Pcp en la línea celular de cáncer de mama humano hormono-dependiente MCF-7 cuando se administró estradiol, pero no cuando se administró tamoxifeno. De este modo la administración de estrógenos a estas células hormono-dependientes disminuye la actividad Pcp, intensificando las funciones de la GnRH. Por el contrario, en la línea celular de cáncer de mama humano hormono-independiente EVSA-T, la actividad Pcp no cambió tras el tratamiento con estradiol. Sin embargo, dicha actividad disminuyó con el tratamiento con tamoxifeno. Aunque el mayor efecto bioquímico del tamoxifeno sobre las células de cáncer de mama es la unión competitiva al ER y la inhibición de la expresión de ciertos genes (Rochefort et al., 1984), se han descrito otros muchos efectos como el bloqueo de la división celular en fase G₁, el incremento en la producción de TGF- β , la inhibición de la producción de IGF β , la disminución de los niveles de IGF1 y el incremento en los niveles de globulina fijadora de hormonas sexuales (Olsen 1998), que podría ser responsable, al menos en parte, de los resultados obtenidos en las células EVSA-T tras el tratamiento con tamoxifeno, sugiriendo que probablemente diversos factores, pero no la GnRH, estén asociados con la patogénesis de los tumores estrógeno-independientes.

6. BIBLIOGRAFÍA.

Behrens BC, Hamilton TC, Masuda H, Grotzinger KR, Whang-Peng J, Louie KG, Knutsen T, McKoy WM, Young RC and Ozols RF: Characterization of a cis-diamminedichloroplatinum(II)-resistant human ovarian cancer cell line and its use in evaluation of platinum analogues. *Cancer Res* 47: 414-418, 1987.

Bernstein L, Ross RK. Endogenous hormones and breast cancer risk. *Epidemiol Rev* 15:48-65, 1993.

Beynon R and Bond J: *Proteolytic Enzymes* New York: Oxford University Press, 2001

Brem SS, Jensen HM, Gullino PM. Angiogenesis as a marker of preneoplastic lesions of the human breast. *Cancer* 41:239-244, 1978.

Brodie AMH and Njar V: Aromatase inhibitors and their application in breast cancer treatment *Steroids* 65: 171-179 , 2000.

Byford JR, Shaw LE, Drew MGB, Pope GS, Sauer MJ, Darbre PD: Oestrogenic activity of parabens in MCF-7 human breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 80: 49-60, 2002.

Cameron DA, Ritchie AA, Miller WR. The relative importance of proliferation and cell death in breast cancer growth and response to tamoxifen. *Eur J Cancer* 37:1545-1553, 2001.

Cameron DA, Keen JC, Dixon JM, Bellamy C, Hanby A, Anderson TJ, Miller WR. Effective tamoxifen therapy of breast cancer involves both antiproliferative and proapoptotic changes. *Eur J Cancer* 36:845-851, 2000.

Carrera MP, Ramirez-Exposito MJ, Valenzuela MT, Garcia MJ, Mayas MD and Martinez-Martos JM: Serum pyrrolidone carboxypeptidase activity in N-methyl nitrosourea induced rat breast cancer. *Horm Metab Res* 35: 502-505, 2003.

Chiarenza A, Lazarovici P, Lempereur L, Cantarella G, Bianchi A and Bernardini R: Tamoxifen inhibits nerve growth factor-induced proliferation of the human breast cancerous cell line MCF-7. *Cancer Res* 61: 3002-3008, 2001.

Colletti RB, Roberts JD, Devlin JT, Copeland KC. Effect of tamoxifen on plasma insulin-like growth factor I in patients with breast cancer. *Cancer Res* 49:1882-1884, 1989.

Couldwell WT, Hinton DR, Surnock AA, DeGeorgio CM, Weiner LP, Apuzzo ML, Masri L, Law RE and Weiss MH: Treatment of recurrent malignant gliomas with chronic oral high-dose tamoxifen. *Clin Cancer Res* 2: 619-622, 1996.

Cummins PM and O'Connor B: Pyroglutamyl peptidase, an overview of the three known enzymatic forms. *Biochim Biophys Acta* 429: 1-17, 1998.

Darbre PD and Daly RJ: Effects of oestrogen on human breast cancer cells in culture. *Proc Royal Soc Edinburgh* 132: 1190-2013, 1989.

del Moral R, Fernandez JC, Lopez-Gonzalez JD, Gomez M, Ruiz de Almodovar JM, Olea N and Pedraza V: Kinetics of cellular proliferation and hormonal receptors in EVSA-T breast cancer cell line. *Rev Esp Fisiol* 47: 25-30, 1991.

Dorland's illustrated medical dictionary. 25th ed. Philadelphia, PA, W.B. Saunders, 1974.

Forbes JF. The control of breast cancer: the role of tamoxifen. *Semin Oncol* 24:S1-5-S1, 1997.

García MJ, Martínez-Martos JM, Mayas MD, Ramírez M and Ramírez-Expósito MJ: Influencia del estradiol sobre la actividad piroglutamato aminopeptidasa en la corteza frontal de ratones ovariectomizados. *Rev Neurol* 33: 425-427, 2001.

Gelmann EP: Tamoxifen for the treatment of malignancies other than breast and endometrial carcinoma. *Semin Oncol* 24: S65-S70, 1997.

González-Palacios JF. Lesiones mamarias preinfiltrantes y riesgo de padecer cáncer de mama. *European School of Oncology* 2003.

Gustafsson JA: Therapeutic potential of selective estrogen receptor modulators. *Curr Opin Chem Biol* 2: 508-511, 1998.

Heerdt AS and Borgen PI. Current status of tamoxifen use: an update for the surgical oncologist. *J Surg Oncol* 72: 42-49, 1999.

Hu YF, Russo IH, Russo J. Prevention of human breast cancer *J Women's Cancer* 25:13-41, 2000.

Huirne JA and Lambalk CB. Gonadotropin- releasing- hormone-receptor antagonists. *Lancet* 358: 1793-1803, 2001.

Imagawa W, Pedchenko VK, Helber J and Zhang H: Hormone/growth factor interactions mediating epithelial/stromal communication in mammary gland development and carcinogenesis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 80: 213-230, 2002.

Jordan VC, Dowse LJ. Tamoxifen as an anti-tumour agent: effect on oestrogen binding. *J Endocrinol* 68:297-303, 1976.

Jordan VC: Long-term tamoxifen treatment for breast cancer. Madison, WI University of Wisconsin Press, 1994

Jordan VC: Laboratory studies to develop general principles for the adjuvant treatment of breast cancer with antiestrogen: Problem and potential for future clinical applications. *Breast Cancer Res Treat* 3: 73-86, 1983.

Kottler ML, Starzec A, Carre MC, Lagarde JP, Martin A and Counis R: The genes for gonadotropin- releasing hormone and its receptor are expressed in human breast with fibrocystic disease and cancer. *Int J Cancer* 71: 595-599, 1997.

Kuukasjarvi T, Karhu R, Tanner M, Kahkonen M, Schaffer A, Nupponen N, Pennanen S, Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Isola J. Genetic heterogeneity and clonal evolution underlying development of asynchronous metastasis in human breast cancer. *Cancer Res* 57:1597-1604, 1997.

Levi LN, Ben-Aroya N, Tel-Or S, Palmon A, Burstein Y, Koch Y. Expression of the gene for the receptor of gonadotropin-releasing hormone in the rat mammary gland. *FEBS Lett* 379:186-190, 1996.

Lu J, Jiang C, Mitrenga T, Cutter G, Thompson HJ. Pathogenic characterization of 1-methyl-1-nitrosourea-induced mammary carcinomas in the rat. *Carcinogenesis* 19:223-227, 1998.

Maggiolini M, Bonofiglio D, Pezzi V, Carpino A, Marsico S, Rago V, Vivacqua A, Picard D and Ando S: Aromatase overexpression enhances the stimulatory effects of adrenal androgens on MCF-7 breast cancer cells. *Mol Cell Endocrinol* 193: 13-18, 2002.

Maiorana A, Gullino PM. Acquisition of angiogenic capacity and neoplastic transformation in the rat mammary gland. *Cancer Res* 38:4409-4414, 1978.

Mantle D, Lauffart B, Gibson A. Purification and characterization of leucyl aminopeptidase and pyroglutamyl aminopeptidase from human skeletal muscle. *Clin Chim Acta* 197:35-45, 1991.

Martínez JM, Ramírez MJ, Prieto I, Alba F and Ramírez M: Sex differences and in vitro effects of steroids on serum aminopeptidase activities. *Peptides* 19: 1637-1640, 1998.

Martínez JM, Ramírez MJ, Prieto I, Petzelt C, Hermoso F, Alba F, Arias Saavedra JM and Ramírez M: Human serum pyroglutamyl- β -naphthylamide hydrolyzing activity during development and aging. *Arch Gerontol Geriatr* 28: 31-36, 1999.

Martínez JM, Prieto I, Ramírez MJ, Cueva C, Alba F and Ramírez M: Aminopeptidase activities in breast cancer tissue. *Clin Chem* 45: 1797-1802, 1999.

McKeon VA: The breast cancer prevention trial: should women at risk take tamoxifen? *J Obstet Gynecol Neonatal Nurs* 28: 34-38, 1999.

Mettlin C. Global breast cancer mortality statistics. *CA Cancer J Clin* 49:138-144, 1999.

Miller BA, Feuer EJ, Hankey BF. The increasing incidence of breast cancer since 1982: relevance of early detection. *Cancer Causes Control* 2:67-74, 1991.

Moriya T, Suzuki T, Pilichowska M, Ariga N, Kimura N, Ouchi N, Nagura H and

Sasanu H: Immunohistochemical expression of gonadotropin releasing hormone receptor in human breast carcinoma. *Pathol Int* 51: 333-337, 2001.

Nahta R, Hortobagyi GN and Esteva FJ. Novel pharmacological approaches in the treatment of breast cancer. *Expert Opin Investig Drugs* 12: 909-917, 2003.

Newcombe PA and Lantz PM: Recent trends in breast cancer incidence, mortality and mammography. *Breast Cancer Res Treat* 28: 97-106, 1993.

O'Higgins N. Aspects of breast cancers. *Chirurgie* 118:324-327, 1992.

Olsen MR and Love RR: Hormonal strategies for the prevention of breast cancer. In: Foon KA and Muss HB (Eds). *Biological and hormonal therapies of cancer* Kluwer Academic Publishers, Boston 1998.

Osborne CK, Boldt DH, Clark GM, Trent JM. Effects of tamoxifen on human breast cancer cell cycle kinetics: accumulation of cells in early G1 phase. *Cancer Res* 43:3583-3585, 1983.

Page DL, Dupont WD, Rogers LW, Rados MS. Atypical hyperplastic lesions of the female breast. A long-term follow-up study. *Cancer* 55:2698-2708, 1985.

Paradiso A, Pezzetta A, Cellamare G, Shittulli F, Marzullo F and Reskin SJ: GnRH receptors in human breast cancer and its contiguous not- involved breast tissue. *J Endocrinol Invest* 23: 90-96, 2000.

Pike MC, Spicer DV, Dahmouch L, Press MF. Estrogens, progestogens, normal breast cell proliferation, and breast cancer risk. *Epidemiol Rev* 15:17-35, 1993.

Powles TJ, Hickish T: Tamoxifen therapy and carcinogenic risk. *J Natl Cancer Inst* 87: 1343-1345, 1995.

Pritchard KI: Endocrine Therapy of advanced disease: analysis and implications of the existing data. *Clin Cancer Res* 9: 4605-4675, 2003.

Ramírez-Expósito MJ, García MJ, Mayas MD, Ramírez M and Martínez-Martos JM: El colesterol de la dieta modifica la actividad piroglutamil aminopeptidasa de la corteza frontal del ratón. *Diferencias sexuales Rev Neurol* 32: 904-907, 2001.

Rocheffort H, Bardon S, Chalbos D, Vignon F: Steroidal and nonsteroidal antiestrogens in breast cancer cells in culture. *J Steroid Biochem* 20: 105-110, 1984.

Rose DP, Pruitt B, Stauber P, Erturk E, Bryan GT. Influence of dosage schedule on the biological characteristics of N-nitrosomethylurea-induced rat mammary tumors. *Cancer Res* 40:235-239, 1980.

Rubinstein LV, Shoemaker RH, Paull KD, Simon RM, Tosini S, Skehan P, Scudiero DA, Monks A and Boyd MR: Comparison of in vitro anticancer-drug-screening data generated with a tetrazolium assay versus a protein assay against a diverse panel of human tumor cell lines. *J Natl Cancer Inst* 82: 1113-1118, 1990.

Ruiz de Almodovar JM, Nuñez MI, McMillan TJ, Olea N, Mort C, Villalobos M, Pedraza V and Steel GG: Initial radiation-induced DNA damage in human tumour cell lines: a correlation with intrinsic cellular radiosensitivity. *Br J Cancer* 69: 457-462, 1994.

Russo J, Calaf G, Russo IH. A critical approach to the malignant transformation of human breast epithelial cells with chemical carcinogens. *Crit Rev Oncog* 4:403-417, 1993.

Russo IH, Russo J. Role of hormones in mammary cancer initiation and progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 3:49-61, 1998.

Russo J, Gusterson BA, Rogers AE, Russo IH, Wellings SR, van Zwieten MJ. Comparative study of human and rat mammary tumorigenesis. *Lab Invest* 62:244-278, 1990.

Russo J, Hu YF, Silva ID, Russo IH. Cancer risk related to mammary gland structure and development. *Microsc Res Tech* 52:204-223, 2001.

Russo J, Russo IH. Biological and molecular bases of mammary carcinogenesis. *Lab Invest* 57:112-137, 1987.

Russo J, Hu YF, Yang X, Russo IH. Developmental, cellular, and molecular basis of human breast cancer. *J Natl Cancer Inst Monogr* 17-37, 2000.

Russo IH, Russo J. Mammary gland neoplasia in long-term rodent studies. *Environ Health Perspect* 104:938-967, 1996.

Santen RJ and Harvey H: Use of aromatase inhibitors in breast carcinoma. *Endocr Related Cancer* 6: 75-92, 1999.

Santen RJ, Manni A, Harvey H and Redmond C: Endocrine treatment of breast cancer in women. *Endocr Rev* 11: 1-45, 1990.

Schomburg L, Bauer K. Thyroid hormones rapidly and stringently regulate the messenger RNA levels of the thyrotropin-releasing hormone (TRH) receptor and the TRH-degrading ectoenzyme. *Endocrinology* 136:3480-3485, 1995.

Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D, Warren JT, Bokesch H, Kenney S and Boyd MR: New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J Natl Cancer Inst* 82: 1107-1112, 1990.

Valenzuela MT, Núñez MI, Villalobos M, Siles E, Olea N, Pedraza V, McMillan TJ and Ruíz de Almodóvar JM: Relationship between doxorubicin cell sensitivity, drug-induced DNA double-strand breaks, glutathione content and P-glycoprotein in mammalian tumor cells. *Anti-Cancer Drugs* 6: 749-757, 1995.

Villalobos M, Becerra D, Nuñez MI, Valenzuela MT, Siles E, Olea N, Pedraza V and Ruiz de Almodovar JM: Radiosensitivity of human breast cancer cell lines of different hormonal responsiveness. Modulatory effects of oestradiol. *Int J Radiat Biol* 70: 161-169, 1996.

Wilk S. Inhibitors of TRH-degrading enzymes. *Ann N Y Acad Sci* 553:252-264, 1989.

Yao K, Jordan VC. Questions about Tamoxifen and the Future Use of Antiestrogens. *Oncologist* 3:104-110, 1998.

Zajchowski D, Sajer R and Webster L: Estrogen inhibits the growth of estrogen receptor- negative, but not estrogen receptor- positive, human mammary epithelial cells expressing a recombinant estrogen receptor. *Cancer Res* 53: 5004-5011, 1993.

.oOo.



**Área de Fisiología
Departamento de Ciencias de la Salud
Facultad de Ciencias Experimentales y de la Salud
Universidad de Jaén**

**ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ESPECÍFICA PIRROLIDÓN
CARBOXIPEPTIDASA (PCP) EN LAS LÍNEAS CELULARES DE
CÁNCER DE MAMA HUMANO ESTRÓGENO-DEPENDIENTE Y
ESTRÓGENO-INDEPENDIENTE MCF-7 Y EVSA-T Y SU
RESPUESTA AL ESTRADIOL Y EL TAMOXIFENO**

**Belén Oya Álvarez de Morales
Trabajo de Investigación Tutelado
Jaén, 2005**

1. INTRODUCCIÓN

1.1. EL CÁNCER DE MAMA

El cáncer de mama es una enfermedad conocida desde el Antiguo Egipto. Un papiro datado entre los años 1600-1500 a.C. refleja, probablemente, la primera cita de un carcinoma mamario de la historia. Por tanto nos encontramos ante una antigua enfermedad, que ha llegado a ser la enfermedad maligna más común causante de muerte entre las mujeres de la Comunidad Europea, incrementándose en los países del Este (O'Higgins, 1992; Miller *et al.*, 1982).

En los años 80 se modificaron conceptos relacionados con el tratamiento quirúrgico y la curación del cáncer de mama, gracias al conocimiento de la biología molecular del inicio y progresión del cáncer así como de la interacción tumor-paciente: se demostraba que el perfil hormonal paracrino y autocrino de la mama en el momento de la extirpación del cáncer modulaba el curso posterior de la enfermedad. Se llegó así a la conclusión de que los mismos factores que eran responsables de la proliferación del tejido mamario normal durante la pubertad y de los cambios cíclicos del ciclo menstrual, están implicados en la promoción, progresión y aparición del cáncer de mama (Forbes, 1997).

El fracaso en la erradicación de esta enfermedad se debe, fundamentalmente, a la dificultad de identificar a un agente etiológico específico, de precisar el momento de inicio y de conocer los mecanismos moleculares responsables del inicio y progresión del cáncer. A pesar de los numerosos desaciertos en torno al origen del cáncer, existen evidencias de que el riesgo de cáncer de mama está relacionado con factores endocrinológicos y reproductivos. Por otro lado, estudios genéticos, epidemiológicos y clínicos han identificado una serie de parámetros biológicos y sociales como factores de riesgo asociados al cáncer de mama. Algunos de ellos serían la evidencia de genes susceptibles, como BRCA1 y BRCA2, la historia familiar de cáncer de mama, ovario o endometrio, la historia individual de desórdenes mamarios, edad avanzada, estatus socioeconómico alto, exceso en la exposición a radiaciones ionizantes o consumo de alcohol (Mettlin, 1999; Pike *et al.*, 1993; Bernstein y Ross, 1993; Hu *et al.*, 2000).

La glándula mamaria es, de hecho, la localización más frecuente de tumores y/o neoplasmas. El término tumor y neoplasma son aplicados indistintamente a lesiones malignas y benignas porque el término tumor (del latín *tumere*) significa cualquier aumento patológico o nuevo crecimiento, como neoplasma (del griego *neos*, nuevo y *plasma*, formación) (Dorland, 1974).

Los tumores benignos son aquellos que no invaden tejidos adyacentes, no se metastatizan a órganos distantes y pueden ser eliminados por extirpación local.

Suelen crecer de forma lenta a lo largo de los años, formando masas cohesivas que permanecen localizadas en su lugar de origen, siendo el fibroadenoma (lesión bien delimitada, de consistencia elástica, que contiene tanto elementos epiteliales como fibrosos) el mas frecuente en la mama femenina. Los tumores malignos, son neoplasmas caracterizados por su habilidad para invadir, metastizarse y en último término, causar la muerte del hospedador, siendo el carcinoma ductal infiltrante el tipo histológico de cáncer de mama más frecuente (65-80 %) (Russo y Russo, 1996a).

La malignidad o benignidad tumoral, ya sean tumores inducidos mediante un carcinógeno o generados de forma espontánea e puede determinar por criterios derivados de un examen macroscópico, histopatológico y analizando el comportamiento biológico del tumor. Los principales criterios a tener en cuenta en un examen macroscópico, una vez realizado un examen general del tumor, son el índice de crecimiento y la apariencia macroscópica. Normalmente los tumores malignos tienden a tener un crecimiento muy rápido. En cuanto a la apariencia macroscópica, los carcinomas en general son suaves y carnosos, están muy bien vascularizados y tienen zonas de necrosis y hemorragias, e incluso algunos pueden contener sangre y material necrotizado, a diferencia de los fibroadenomas que son blancos, con una consistencia firme y elástica.

Entre los criterios histopatológicos de malignidad, el más importante es la pérdida del modelo tubular-alveolar de la glándula mamaria normal. Citológicamente, las células malignas son más grandes que sus homologas normales y existe un incremento en la proporción nucleocitoplasmática (Russo y Russo, 2000). La heterogeneidad epitelial presente en la glándula mamaria normal o incluso en las lesiones benignas, donde podemos encontrar células mioepiteliales, oscuras, intermedias o claras, raramente se observa en lesiones malignas (Russo *et al.*, 1983). El tipo celular predominante en lesiones malignas es de tipo intermedio, siendo difícil encontrar células oscuras. Por otro lado, el número de mitosis es generalmente mayor en lesiones malignas que en benignas (Russo y Russo, 1987).

En cuanto al criterio biológico de malignidad más fiable, sería la capacidad de un tumor de metastizarse hacia órganos distantes, aunque la habilidad de lesiones neoplásicas para generar angiogénesis ha sido también propuesta para ser un marcador biológico de malignidad, aunque todavía su uso no está muy extendido (Brem *et al.*, 1978; Maiorana y Gullino, 1978).

Se ha sugerido que el desarrollo de metástasis a distancia es una etapa tardía en la progresión de carcinoma mamario, que ocurre por adquisición de alteraciones genéticas que hacen a la célula competente para colonizar y proliferar

en los distintos órganos. No obstante, algunos estudios han planteado una hipótesis alternativa, al encontrar no solo que algunas metástasis no comparten los cambios moleculares de los tumores primarios, sino que además, metástasis en órganos distintos de un mismo primario divergen también en su perfil genético (Kuukasjarvi *et al.*, 1997). Así mismo se indica el carácter específico de los genes implicados en la metástasis en distintos órganos, siendo diferentes los implicados, por ejemplo, en las metástasis óseas frente a las de glándula suprarrenal.

De hecho, el proceso de tumorigénesis mamaria resulta de la progresión de benigno a maligno, donde la acumulación de múltiples cambios genéticos desencadenan la evolución de un epitelio normal mamario a través de lesiones proliferativas benignas, a lesiones proliferativas atípicas, finalizando en carcinomas *in situ* y tumores invasivos.

Es difícil, a la vista de los conocimientos actuales, enumerar lesiones que en sentido estricto puedan considerarse iniciales del cáncer mamario. Desde principios del siglo XIX se conoce que la enfermedad mamaria benigna pueda ser precursora del cáncer y por estudios más recientes, ya históricos, que algunas lesiones, en particular hiperplasias y carcinomas *in situ*, pueden preceder al carcinoma invasivo, existiendo un aparente continuo histológico entre ellos y también una presencia coincidente en la misma mama. Hay mujeres con procesos mamarios, como hiperplasias usuales, hiperplasias atípicas y carcinomas *in situ* que tienen un incremento en el riesgo relativo de padecer cáncer (Page *et al.*, 1985).

El dogma biológico del cáncer parece cumplirse también en la mama, considerándose que un cáncer invasivo está precedido por una serie de pasos intermedios. En un sentido general y quizás inapropiado, algunas de estas etapas, especialmente las que conllevan mayor riesgo de cáncer invasivo se consideran lesiones iniciales del carcinoma. Otras, como el carcinoma ductal *in situ*, además tienen algún rasgo fenotípico de malignidad, pero carecen de la habilidad de invadir y metastizar, por lo que en este sentido son lesiones premalignas, preinvasivas o precursoras (González-Palacios, 2003).

1.2. LA ACTIVIDAD PIRROLIDÓN CARBOXIPEPTIDASA.

La pirrolidón carboxipeptidasa (Pcp), también conocida como piroglutamil aminopeptidasa es una omega-peptidasa que hidroliza residuos piroglutamil terminales de péptidos, proteínas y derivados de arilamidas de manera altamente selectiva, jugando un papel fisiológico en la regulación de la circulación de péptidos biológicamente activos como la hormona liberadora de tirotrópina (TRH) y la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH). Sin embargo, aunque su acción

hidrolítica sobre péptidos y sustratos artificiales ha sido ampliamente estudiada, el papel fisiológico de esta enzima y su mecanismo de regulación no son bien conocidos. Otros estudios han sugerido la influencia de esteroides gonadales sobre esta actividad en suero, existiendo la posibilidad de que estas sustancias ayuden a crear un ambiente bioquímico que regule, al menos en parte, la actividad de estas enzimas.

Existen dos actividades específicas y diferenciadas de la pirrolidón carboxipeptidasa según la localización, la actividad pirrolidón carboxipeptidasa I, localizada a nivel citosólico, y la actividad pirrolidón carboxipeptidasa II, localizada a nivel de membrana (también llamadas piroglutamato aminopeptidasas I y II, Pcp I y Pcp II, respectivamente). También se ha descrito esta actividad a nivel del suero, donde se le denomina tiroliberinas (Cummins y O'Connor, 1998).

1.2.1. Pirrolidón Carboxipeptidasa I

- *Clasificación de peptidasas*: Clan CF, familia C15, MEROPS ID: C15.010

- *Clasificación enzimática del NC-IUBMB*: E.C. 3.4.19.3.

Acción. Libera un grupo piroglutámico N-terminal de péptidos y proteínas, no siendo el segundo aminoácido Pro, además de aminoacil-~~S~~naftilamidas, aminoacil-metilcumarinas y aminoacil-~~D~~nitroanilidas.

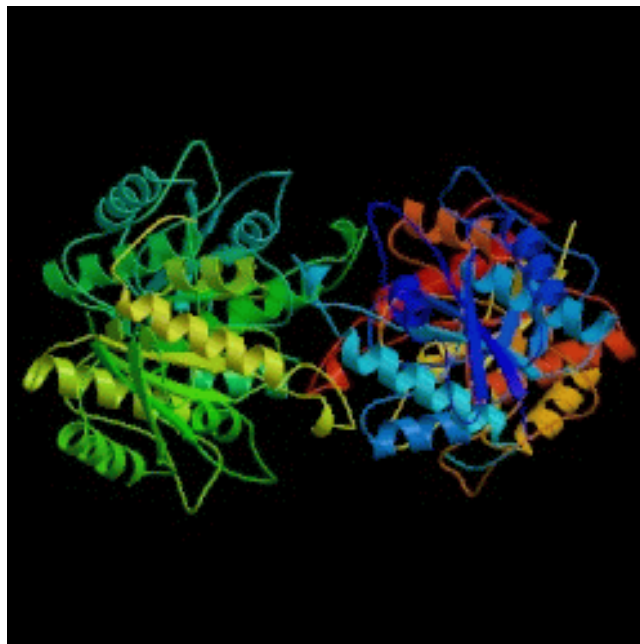


Figura 1. Estructura tridimensional propuesta para la enzima pirrolidón carboxipeptidasa I.

Sustrato artificial. pGlu-~~S~~naftilamida

Propiedades

moleculares. Cistein-peptidasa monomérica de 24 KDa y pH óptimo entre 6.5-8.5. es un enzima sulfidril-dependiente, mostrando un requerimiento estricto de agentes como el DTT o 2-mercaptoetanol (2-ME). Se inhibe por iodoacetamida y otros agentes bloqueantes de grupos sulfidrilos. También es muy sensible a trazas de metales pesados. Tiene dos residuos de Cys, uno de los cuales está implicado en su actividad catalítica (*Figura 1.*).

Distribución. Exopeptidasa ampliamente distribuida por diferentes especies y tejidos a nivel citosólico, tales como músculo esquelético, cerebro y riñón.

Aspectos

biológicos. Capaz de liberar residuos piroglutámicos N-terminales de péptidos biológicamente activos, incluyendo TRH, GnRH, neurotensina y bombesina. Aunque su papel no está claro todavía, puede contribuir al catabolismo intracelular de péptidos hacia aminoácidos libres, los cuales pueden ser reincorporados a rutas biosintéticas (Mantle *et al.*, 1991).

1.2.2. Pirrolidón carboxipeptidasa II

- *Clasificación de peptidasas:* Clan MA, familia M1, MEROPS ID: M01.008

- *Clasificación enzimática del NC-UIBMB:* E.C. 3.4.19.6.

Acción. Libera el grupo piroglutámico N-terminal de tripéptidos pGlu-His-X y tetrapéptidos pGlu-His-X-Gly, con estrecha especificidad por sustratos como la TRH, además de el Glu del Glu-His-Pro-~~S~~naftilamidas.

Sustrato artificial. pGlu-~~S~~naftilamida

Propiedades

moleculares. Metalopeptidasa glicosilada, zinc-dependiente de alto peso molecular, 230 KDa, formada por dos subunidades. Se inhibe por 1,10-fenantrolina y agentes quelantes como el EDTA. PH óptimo de 7.3.

Distribución. Ectoenzima localizada concretamente como proteína integral de membrana en la superficie de células neuronales (no células gliales), aunque también se encuentra en todo el SNC, retina, pulmón y otros tejidos.

Aspectos

biológicos. La alta especificidad por su sustrato TRH o análogos de TRH (Wilk, 1989). Está regulada por hormonas tiroideas (Schomburg y Bauer, 1995) y estrógenos (Cummins y O'Connor, 1998) de forma específica de tejido.

1.2.3. La actividad pirrolidón carboxipeptidasa y el cáncer de mama

Si bien se sabe que la participación hormonal tanto en el desarrollo normal como de carcinomas en la mama es fundamental, es más limitado el conocimiento que se tiene de algunos enzimas reguladores de hormonas peptídicas, como es el caso de la Pcp. Se han llevado a cabo algunos estudios tanto en modelos animales (inducidos por N-metil-nitrosourea -NMU-) como en humanos. La inducción de tumores mediante NMU se caracteriza por inducir tumores estrógeno dependientes (Rose *et al.*, 1980), siendo uno de sus principales atributos que la proporción de carcinomas mamarios que son ovario-dependientes es similar a la observada en la enfermedad en humanos (Luet *et al.*, 1998). La dependencia estrogénica de dichos tumores inducidos mediante NMU podría relacionarse con la disminución observada en la actividad Pcp en el suero de estos animales. Trabajos previos mostraron cambios en la actividad Pcp en cáncer de mama en mujeres, a nivel de tejido tumoral y adyacente, confirmándose que cambios en esta enzima o en sus posibles sustratos pueden tener un importante papel en la patogénesis del cáncer de mama (Martínez *et al.*, 1999).

Ya que uno de los sustratos susceptibles de la Pcp es la GnRH, la disminución observada en su actividad indicaría la existencia de altos niveles circulantes de esta hormona peptídica. En este sentido, se han localizado en tejido mamario receptores para GnRH (GnRH-R), sugiriéndose un papel local de la GnRH

en la glándula mamaria humana (Kottler *et al.*, 1997). También han sido inmunolocalizados GnRH-R en el citoplasma de células tumorales e incluso en el citoplasma de células morfológicamente normales del epitelio glandular adyacente al carcinoma. Aunque se han encontrado GnRH-R tanto en tejido normal como en tumoral, la presencia de GnRH-R fue superior en tejido tumoral que en el no tumoral (Paradiso *et al.*, 2000). De cualquier forma el aumento en los niveles de GnRH conduce a un incremento en los niveles de hormonas esteroideas gonadales (Huirne y Lambalk, 2001) como el estradiol, que estimula tanto la actividad mitótica como el crecimiento del tejido epitelial mamario, conduciendo a un aumento de la sensibilidad al carcinógeno. Por tanto la disminución de la actividad Pcp, nos podría hacer suponer un aumento de los niveles de GnRH, lo que se traduce en un aumento en la producción de hormonas esteroideas gonadales, responsables, al menos en parte del inicio y desarrollo de esta enfermedad.

Como hemos comentado, el riesgo de cáncer de mama, esta fuertemente influenciado por parámetros endocrinos y reproductivos (Russo *et al.*, 2001).

El aumento en los niveles de GnRH supondría un aumento en los niveles de esteroides sexuales. De hecho, se han localizado receptores, tanto para estradiol y progesterona como para prolactina y el factor de crecimiento epitelial (EGF, del inglés Epithelial Growth Factor) en tumores desarrollados en rata siguiendo este mismo modelo. La localización de receptores para estrógenos en el total de los tumores, sugiere una sensibilidad uniforme a la manipulación hormonal, es decir, hormono dependencia. En humanos, el hecho de que las células proliferantes sean distintas de aquellas que son positivas para ER y PgR, apoyan los datos que indican que los estrógenos controlan la proliferación celular por mecanismos indirectos.

En este sentido, la actividad proliferativa y el mayor porcentaje de células positivas para ER y PgR se encuentra en las estructuras lobulares tipo1. Hecho que justifica el que estas estructuras sean las que tienen un mayor grado de susceptibilidad para ser transformadas por carcinógenos *in vitro* (Russo *et al.*, 1998; Russo *et al.*, 1993), apoyando igualmente las observaciones de que las estructuras Lob 1 son el origen de carcinomas ductales (Russo *et al.*, 1990).

Sin embargo, también se ha descrito tanto en la glándula mamaria de rata como en humanos, ARNm tanto para GnRH como para receptores de GnRH. Este péptido puede actuar de forma autocrina o paracrina, aunque, en el caso de la rata esta expresión solo ha sido detectada en ratas gestantes o lactantes, pero no en ratas vírgenes (Levi *et al.*, 1996).

En el modelo animal de cáncer de mama, la actividad específica Pcp en la propia mama mostró un incremento significativo en su actividad soluble (Pcp I) y

unida a membrana (Pcp II) que podría ser consecuencia de los altos niveles circulantes de GnRH, regulando de este modo su función autocrina / paracrina a nivel de la mama. En este sentido, estudios llevados a cabo en nuestro laboratorio muestran un descenso notable de la actividad Pcp II en tejido adyacente y neoplásico de pacientes con cáncer de mama, si bien la actividad Pcp soluble no muestra ningún cambio. Las diferencias en el comportamiento de dicha actividad en glándula mamaria, sugiere que modificaciones en esta enzima o en su sustrato juegan un importante papel en el cáncer de mama aunque queda por delimitar exactamente el mecanismo de acción (Martínez *et al.*, 1999).

En este sentido, el hecho de que no existan diferencias en la expresión del ARNm del receptor de GnRH entre ratas vírgenes, gestantes y lactantes, implica que la activación de los receptores de GnRH en glándula mamaria está regulada por la disponibilidad de GnRH (Levi *et al.*, 1996). Estos datos apoyarían los resultados obtenidos para la actividad Pcp en este modelo. Como también se ha descrito, la actividad Pcp hipotalámica, que no está sujeta a una regulación por estrógenos u otras hormonas, también disminuye significativamente, favoreciendo el incremento de los niveles circulantes de GnRH. A modo de resumen podemos indicar que los cambios en la actividad Pcp en el tejido tumoral supone una respuesta a niveles potencialmente elevados de GnRH, que pueden modificar la función autocrina / paracrina de esta hormona a nivel de la mama (*Figura 2.*).

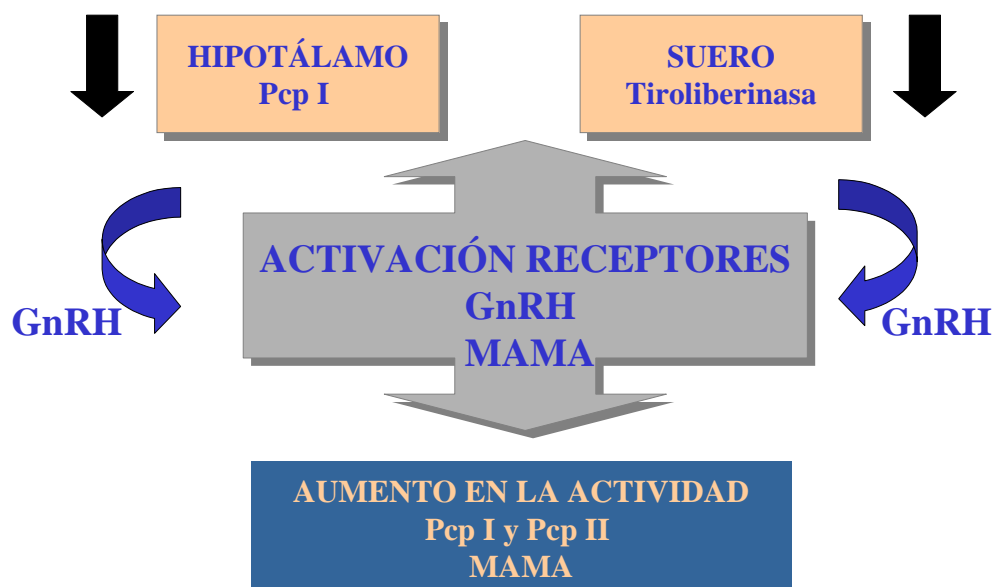


Figura 2. Posible relación de las actividades Pcp hipotalámica, sérica y mamaria en la determinación de los niveles de GnRH en glándula mamaria.

2. PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS

El cáncer de mama es la causa de muerte más común producida por tumores entre las mujeres del mundo desarrollado. Los mecanismos de regulación hormonal del crecimiento del tumor han sido descritos para los tumores de mama, las líneas celulares y los tumores inducidos experimentalmente. La enzima pirrolidón carboxipeptidasa (Pcp) está modificada en cáncer de mama humano en cáncer de mama de rata, en un modelo inducido por N-metil-nitrosourea, lo que indica que esta actividad participa en la patogénesis del cáncer de mama. Puesto que diversos estudios demuestran, además, la influencia de las hormonas sexuales sobre la actividad Pcp tanto en humanos como en roedores (Martínez et al., 1998; 1999b; Ramírez-Expósito et al., 2001; García et al., 2001) el objetivo de este trabajo es analizar la respuesta de la actividad Pcp, tras la incubación con estradiol y tamoxifeno, en las líneas celulares de cáncer de mama humano estrógeno-dependiente MCF-7 (Darbre y Dali, 1989; Byford et al., 2002) y estrógeno-independiente EVSA-T (Villalobos et al., 1996; del Moral et al., 1991). El tamoxifeno es un modulador selectivo de los receptores de estrógenos, que inhibe de forma competitiva la unión del estradiol a sus receptores (Jordan y Dowse, 1976). Mediante este mecanismo, interfiere en diversos mecanismos celulares implicados en la regulación de la división celular. Las interferencias causadas por el tamoxifeno modifica el perfil de factores de crecimiento en los tejidos diana y provoca que las células se detengan en la fase G₁ del ciclo celular (Osborne et al., 1983; Colleti et al., 1989). Esto induce cambios en los mecanismos de proliferación celular del tumor y con ello, muerte celular. El resultado neto obtenido es una respuesta antitumoral del tamoxifeno (Cameron et al., 2000; Cameron et al., 2001) y con ello, un incremento de la supervivencia (Yao y Jordan, 1998).

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Cultivos Celulares

En el presente estudio se han utilizado las líneas celulares humanas de cáncer de mama hormono-dependiente MCF-7 y hormono-independiente EVSA-T. Estas líneas celulares se cultivaron en DMEM (Dubelcco's modified Eagle's medium) suplementado con un 5% de suero bovino fetal. El medio de cultivo contenía penicilina (100 unidades/ml) y estreptomycin (0.1 mg/ml). Las células se incubaron a 37°C en una atmósfera al 5% de CO₂. La contaminación por micoplasmas fue descartada empleando Hoescht 33528.

3.2. Ensayo colorimétrico de citotoxicidad

El ensayo colorimétrico de citotoxicidad (ECC) para la determinación de la capacidad antiproliferativa de los dos compuestos estudiados (estradiol y tamoxifeno) se llevó a cabo tripsinizando los cultivos y diluyéndolos para obtener 4×10^4 células/ml. Las células se encontraban en fase de crecimiento exponencial durante todo el experimento. En placas de cultivo de 24 pocillos (Nunc), se pipetearon alícuotas de 1 ml de células y se incubaron las placas durante 24 horas. Soluciones madre en dimetil sulfóxido (DMSO) de ambos compuestos (estradiol y tamoxifeno) se añadieron a los pocillos en un volumen final de 1 ml por pocillo en medio de cultivo, para obtener un rango de concentraciones de 0.01-10 : M, por cuadruplicado. Tras tres días de incubación, se eliminó el medio de los cultivos, se lavó con tampón fosfato salino (PBS) y se fijó con ácido tricloroacético (TCA) al 10% durante 30 minutos a 4 °C. Posteriormente se lavó con agua corriente para eliminar el TCA. Se dejaron secar las placas y las células así fijadas se tiñeron durante 20 minutos con sulforrodamina B (SRB; Sigma) al 0.4% en ácido acético al 1%. Tras finalizar el periodo de tinción, la SRB se eliminó y se lavaron los cultivos con ácido acético al 1% para eliminar el colorante no unido. Se dejaron secar las placas, y el colorante unido se solubiliza con tampón Tris 10 mM, pH 10.5 y se mide la densidad óptica en un lector de placas (ThermoLabsystems multiscan Ascent) a 492 nm de longitud de onda. La respuesta fotométrica fue lineal con respecto a la concentración de colorante y proporcional al número de células, contadas en paralelo con un hemocitómetro.

3.3. Determinación de la actividad específica pirrolidón carboxipeptidasa

La actividad Pcp fue determinada, mediante un método fluorimétrico, frente al sustrato L-piroglutamil-~~S~~naftilamida (pGluNNap). Así, para determinar el efecto de los dos compuestos estudiados (estradiol y tamoxifeno), se tripsinizaron los cultivos y se diluyeron para obtener 4×10^4 células/ml. Las células se encontraban en fase de crecimiento exponencial durante todo el experimento. En placas de cultivo de 24 pocillos (Nunc), se pipetearon alícuotas de 1 ml de células y se incubaron las placas durante 24 horas. Soluciones madre en dimetil sulfóxido (DMSO) de ambos compuestos (estradiol y tamoxifeno) se añadieron a los pocillos en un volumen final de 1 ml por pocillo en medio de cultivo, para obtener un rango de concentraciones de 0.01-10 : M, por cuadruplicado. Tras tres días de incubación, se eliminó el medio de los cultivos y se lavó con PBS. Posteriormente, a cada pocillo de la placa de cultivo se le añaden 250 : l de medio de cultivo sin suero bovino fetal, conteniendo pGluNNap 100 : M. Tras incubar durante 30 minutos a 37 °C, se para

la reacción añadiendo 250 : L de tampón acetato 0.1 M pH 4.2. La fluorescencia de la β -naftilamina liberada como resultado de la actividad enzimática se determinó utilizando una longitud de onda de excitación de 345 nm y una longitud de onda de emisión de 412 nm. La actividad enzimática específica Pcp se expresa en nanomoles de sustrato hidrolizado por minuto y por 10^5 células, utilizando una curva estándar de β -naftilamina determinada en las mismas condiciones. La respuesta fluorimétrica fue lineal con respecto al tiempo de hidrólisis y el número de células.

3.4. Análisis estadístico

Para analizar las diferencias entre grupos, se ha utilizado un análisis de la varianza de una vía (ANOVA), seguido del test de rango múltiple de Newman-Keuls. Todas las comparaciones con valores de $p < 0.05$ se consideraron significativas.

4. RESULTADOS

La figura 3 muestra las curvas de inhibición del crecimiento para las líneas celulares hormono-dependiente y hormono-independiente MCF-7 y EVSA-T, determinadas mediante el ensayo colorimétrico de citotoxicidad, tras el tratamiento con estradiol y tamoxifeno. Se observa como el tratamiento con estradiol, a ninguna de las concentraciones utilizadas, modifica las curvas de crecimiento en ninguna de las dos líneas celulares (figura 3A). Sin embargo, el tamoxifeno, aunque solo a la mayor concentración utilizada (10 : M), inhibe significativamente ($p < 0.01$) las curvas de crecimiento de ambas líneas celulares MCF-7 y EVSA-T (figura 3B).

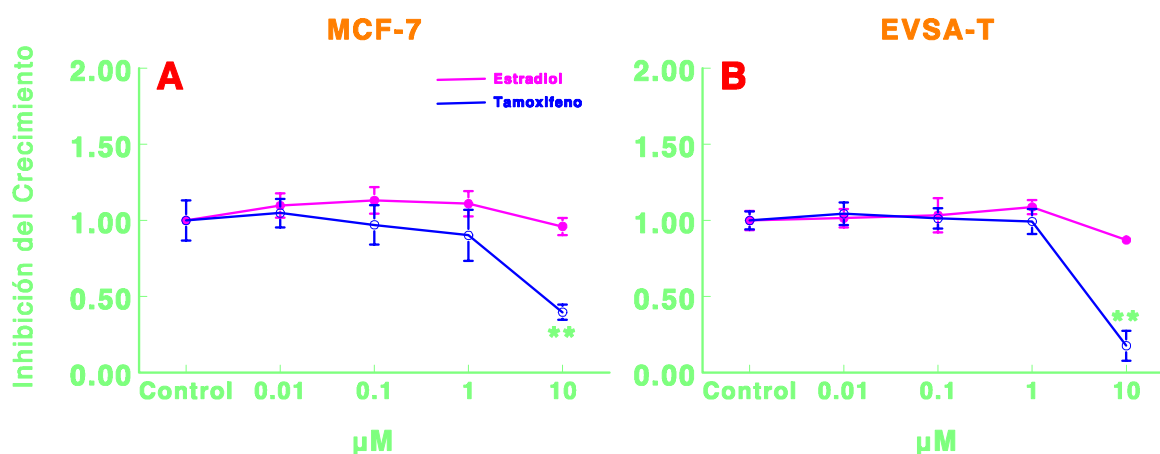


Figura 3. Curvas de inhibición del crecimiento celular para las líneas celulares de cáncer de mama humano hormono-dependiente MCF-7 y hormono-independiente EVSA-T, analizadas por el ensayo colorimétrico de citotoxicidad, tras el tratamiento con estradiol y tamoxifeno (Media \pm EEM; $n=4$; ** $p < 0.01$).

La figura 4 muestra la actividad específica Pcp en las líneas celulares hormono-dependiente MCF-7 y hormono-independiente EVSA-T, tras el tratamiento con estradiol y tamoxifeno. Por lo que respecta a las células MCF-7, el tratamiento con estradiol disminuye la actividad Pcp de forma significativa ($p < 0.05$ para las concentraciones 0.1 y 1 : M y $p < 0.01$ para la concentración 10 : M). Sin embargo, cuando las células MCF-7 son tratadas con tamoxifeno, la actividad específica Pcp no se modifica para ninguna de las concentraciones utilizadas (figura 4A). Por el contrario, el tratamiento de las células EVSA-T con estradiol no modifica la actividad específica Pcp a ninguna de las concentraciones utilizadas, mientras que el tratamiento con tamoxifeno disminuye significativamente ($p < 0.01$) la actividad específica Pcp a partir de una concentración 0.1 : M (figura 4B).

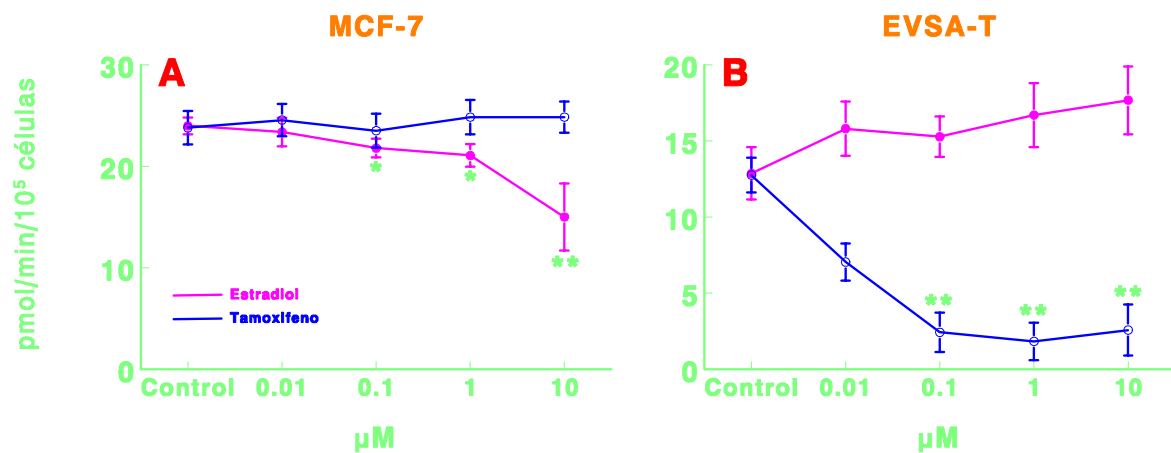


Figura 4. Niveles de actividad específica pirrolidón carboxipeptidasa (Pcp) en las líneas celulares de cáncer de mama humano hormono-dependiente MCF-7 y hormono-independiente EVSA-T tras el tratamiento con estradiol y tamoxifeno (Media ± EEM; n=4; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

5. DISCUSIÓN

Trabajos previos llevados a cabo en cáncer de mama humano, han descrito una disminución significativa de la actividad específica Pcp en tejidos neoplásicos y adyacentes, cuando se compara con la actividad específica Pcp de tejidos no afectados, lo que indicaría que ciertos factores locales pueden ser selectivamente modificados por el proceso tumoral en el tejido afectado (Martínez et al., 1999a). También, en cáncer de mama inducido en ratas mediante N-metil nitrosourea, se ha descrito una disminución de la actividad Pcp en suero, lo que sugiere que esta actividad enzimática está implicada en la patogénesis del cáncer. Puesto que uno de los sustratos sobre los que actúa la Pcp es la GnRH, los resultados de este

estudio indicarían que la regulación de los niveles de esta hormona peptídica a través de su enzima proteolítico regulador podría ser un factor clave en el desarrollo de la enfermedad. En relación con esto, se han encontrado receptores y ARNm de GnRH en tejido mamario, lo que sugiere un papel fisiológico local para la GnRH en la glándula mamaria (Kottler et al., 1997). De hecho, el receptor de GnRH (GnRH-R) había sido inmunolocalizado en el citoplasma de células de carcinoma y también fue detectado de forma limitada en el citoplasma de células morfológicamente normales del epitelio glandular adyacentes al carcinoma. Este estudio indica que el GnRH-R está ampliamente distribuido en las células de carcinoma de mama y que regula localmente las acciones de la GnRH (Moriya et al., 2001). Aunque el GnRH-R había sido encontrado tanto en tejidos normales como en cancerígenos, la prevalencia de GnRH-R era mayor en tejidos tumorales que en no tumorales (Paradiso et al., 2000). Todos estos resultados indican que la GnRH probablemente es un factor local importante que actúa a nivel intracrino, autocrino y/o paracrino en la patogénesis del cáncer de mama y sugieren que está implicada en el proceso tumoral de forma más que importante.

Además, la elevación de los niveles de GnRH está asociada con niveles incrementados de hormonas esteroides gonadales (Huirne and Lambalk, 2001). La transformación de células de mama normales, la iniciación y el mantenimiento del crecimiento del tumor, depende de la interconexión de numerosos factores inhibidores y estimulantes, entre los que destacan los estrógenos (Chiarenza et al., 2001). Los estrógenos estimulan el crecimiento del cáncer de mama aproximadamente en un tercio de los pacientes, mientras que su privación induce una regresión del tumor (Santen et al., 1990). De modo que, el objetivo principal del tratamiento endocrino del cáncer de mama es la inhibición de la actividad estrogénica, bien mediante el bloqueo de los receptores estrogénicos (ER) o bien impidiendo su producción (Gustafsson, 1998; Santen and Harvey, 1999; Brodie and Njar, 2000; Maggiolini et al., 2002). De este modo, la manipulación hormonal juega un papel importante en el tratamiento del cáncer de mama ER-positivo porque no sólo es efectivo, sino que además se asocia con una mínima toxicidad y una excelente calidad de vida (Pritchard, 2003). Uno de los fármacos que se utilizan son los llamados “moduladores ER selectivos” (SERMs). Su mecanismo de acción está basado en que compiten directamente con los estrógenos por su unión al receptor, evitando los mecanismos de señalización intracelular posteriores. El tamoxifeno es un SERMs, con potentes acciones antiestrogénicas, muy usado en el tratamiento del cáncer de mama ER-positivo (Jordan, 1994; Powles and Hickish, 1995; Mckeon, 1999; Nahta et al., 2003), aunque también se utiliza en el tratamiento adyuvante de

otros tumores incluyendo los gliomas malignos (Couldwell et al., 1996; Gelmann, 1997; Heerdt and Borgen, 1999). Se ha demostrado que las altas concentraciones de tamoxifeno inhiben la proliferación celular e inducen apoptosis (Gelmann, 1997). Los resultados del presente estudio apoyan estos datos.

En este trabajo hemos encontrado una disminución de la actividad Pcp en la línea celular de cáncer de mama humano hormono-dependiente MCF-7 cuando se administró estradiol, pero no cuando se administró tamoxifeno. De este modo la administración de estrógenos a estas células hormono-dependientes disminuye la actividad Pcp, intensificando las funciones de la GnRH. Por el contrario, en la línea celular de cáncer de mama humano hormono-independiente EVSA-T, la actividad Pcp no cambió tras el tratamiento con estradiol. Sin embargo, dicha actividad disminuyó con el tratamiento con tamoxifeno. Aunque el mayor efecto bioquímico del tamoxifeno sobre las células de cáncer de mama es la unión competitiva al ER y la inhibición de la expresión de ciertos genes (Rochefort et al., 1984), se han descrito otros muchos efectos como el bloqueo de la división celular en fase G₁, el incremento en la producción de TGF- β , la inhibición de la producción de IGF β , la disminución de los niveles de IGF1 y el incremento en los niveles de globulina fijadora de hormonas sexuales (Olsen 1998), que podría ser responsable, al menos en parte, de los resultados obtenidos en las células EVSA-T tras el tratamiento con tamoxifeno, sugiriendo que probablemente diversos factores, pero no la GnRH, estén asociados con la patogénesis de los tumores estrógeno-independientes.

6. BIBLIOGRAFÍA.

Behrens BC, Hamilton TC, Masuda H, Grotzinger KR, Whang-Peng J, Louie KG, Knutsen T, McKoy WM, Young RC and Ozols RF: Characterization of a cis-diamminedichloroplatinum(II)-resistant human ovarian cancer cell line and its use in evaluation of platinum analogues. *Cancer Res* 47: 414-418, 1987.

Bernstein L, Ross RK. Endogenous hormones and breast cancer risk. *Epidemiol Rev* 15:48-65, 1993.

Beynon R and Bond J: *Proteolytic Enzymes* New York: Oxford University Press, 2001

Brem SS, Jensen HM, Gullino PM. Angiogenesis as a marker of preneoplastic lesions of the human breast. *Cancer* 41:239-244, 1978.

Brodie AMH and Njar V: Aromatase inhibitors and their application in breast cancer treatment *Steroids* 65: 171-179 , 2000.

Byford JR, Shaw LE, Drew MGB, Pope GS, Sauer MJ, Darbre PD: Oestrogenic activity of parabens in MCF-7 human breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 80: 49-60, 2002.

Cameron DA, Ritchie AA, Miller WR. The relative importance of proliferation and cell death in breast cancer growth and response to tamoxifen. *Eur J Cancer* 37:1545-1553, 2001.

Cameron DA, Keen JC, Dixon JM, Bellamy C, Hanby A, Anderson TJ, Miller WR. Effective tamoxifen therapy of breast cancer involves both antiproliferative and proapoptotic changes. *Eur J Cancer* 36:845-851, 2000.

Carrera MP, Ramirez-Exposito MJ, Valenzuela MT, Garcia MJ, Mayas MD and Martinez-Martos JM: Serum pyrrolidone carboxypeptidase activity in N-methyl nitrosourea induced rat breast cancer. *Horm Metab Res* 35: 502-505, 2003.

Chiarenza A, Lazarovici P, Lempereur L, Cantarella G, Bianchi A and Bernardini R: Tamoxifen inhibits nerve growth factor-induced proliferation of the human breast cancerous cell line MCF-7. *Cancer Res* 61: 3002-3008, 2001.

Colletti RB, Roberts JD, Devlin JT, Copeland KC. Effect of tamoxifen on plasma insulin-like growth factor I in patients with breast cancer. *Cancer Res* 49:1882-1884, 1989.

Couldwell WT, Hinton DR, Surnock AA, DeGeorgio CM, Weiner LP, Apuzzo ML, Masri L, Law RE and Weiss MH: Treatment of recurrent malignant gliomas with chronic oral high-dose tamoxifen. *Clin Cancer Res* 2: 619-622, 1996.

Cummins PM and O'Connor B: Pyroglutamyl peptidase, an overview of the three known enzymatic forms. *Biochim Biophys Acta* 429: 1-17, 1998.

Darbre PD and Daly RJ: Effects of oestrogen on human breast cancer cells in culture. *Proc Royal Soc Edinburgh* 132: 1190-2013, 1989.

del Moral R, Fernandez JC, Lopez-Gonzalez JD, Gomez M, Ruiz de Almodovar JM, Olea N and Pedraza V: Kinetics of cellular proliferation and hormonal receptors in EVSA-T breast cancer cell line. *Rev Esp Fisiol* 47: 25-30, 1991.

Dorland's illustrated medical dictionary. 25th ed. Philadelphia, PA, W.B. Saunders, 1974.

Forbes JF. The control of breast cancer: the role of tamoxifen. *Semin Oncol* 24:S1-5-S1, 1997.

García MJ, Martínez-Martos JM, Mayas MD, Ramírez M and Ramírez-Expósito MJ: Influencia del estradiol sobre la actividad piroglutamato aminopeptidasa en la corteza frontal de ratones ovariectomizados. *Rev Neurol* 33: 425-427, 2001.

Gelmann EP: Tamoxifen for the treatment of malignancies other than breast and endometrial carcinoma. *Semin Oncol* 24: S65-S70, 1997.

González-Palacios JF. Lesiones mamarias preinfiltrantes y riesgo de padecer cáncer de mama. *European School of Oncology* 2003.

Gustafsson JA: Therapeutic potential of selective estrogen receptor modulators. *Curr Opin Chem Biol* 2: 508-511, 1998.

Heerdt AS and Borgen PI. Current status of tamoxifen use: an update for the surgical oncologist. *J Surg Oncol* 72: 42-49, 1999.

Hu YF, Russo IH, Russo J. Prevention of human breast cancer *J Women's Cancer* 25:13-41, 2000.

Huirne JA and Lambalk CB. Gonadotropin- releasing- hormone-receptor antagonists. *Lancet* 358: 1793-1803, 2001.

Imagawa W, Pedchenko VK, Helber J and Zhang H: Hormone/growth factor interactions mediating epithelial/stromal communication in mammary gland development and carcinogenesis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 80: 213-230, 2002.

Jordan VC, Dowse LJ. Tamoxifen as an anti-tumour agent: effect on oestrogen binding. *J Endocrinol* 68:297-303, 1976.

Jordan VC: Long-term tamoxifen treatment for breast cancer. Madison, WI University of Wisconsin Press, 1994

Jordan VC: Laboratory studies to develop general principles for the adjuvant treatment of breast cancer with antiestrogen: Problem and potential for future clinical applications. *Breast Cancer Res Treat* 3: 73-86, 1983.

Kottler ML, Starzec A, Carre MC, Lagarde JP, Martin A and Counis R: The genes for gonadotropin- releasing hormone and its receptor are expressed in human breast with fibrocystic disease and cancer. *Int J Cancer* 71: 595-599, 1997.

Kuukasjarvi T, Karhu R, Tanner M, Kahkonen M, Schaffer A, Nupponen N, Pennanen S, Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Isola J. Genetic heterogeneity and clonal evolution underlying development of asynchronous metastasis in human breast cancer. *Cancer Res* 57:1597-1604, 1997.

Levi LN, Ben-Aroya N, Tel-Or S, Palmon A, Burstein Y, Koch Y. Expression of the gene for the receptor of gonadotropin-releasing hormone in the rat mammary gland. *FEBS Lett* 379:186-190, 1996.

Lu J, Jiang C, Mitrenga T, Cutter G, Thompson HJ. Pathogenic characterization of 1-methyl-1-nitrosourea-induced mammary carcinomas in the rat. *Carcinogenesis* 19:223-227, 1998.

Maggiolini M, Bonofiglio D, Pezzi V, Carpino A, Marsico S, Rago V, Vivacqua A, Picard D and Ando S: Aromatase overexpression enhances the stimulatory effects of adrenal androgens on MCF-7 breast cancer cells. *Mol Cell Endocrinol* 193: 13-18, 2002.

Maiorana A, Gullino PM. Acquisition of angiogenic capacity and neoplastic transformation in the rat mammary gland. *Cancer Res* 38:4409-4414, 1978.

Mantle D, Lauffart B, Gibson A. Purification and characterization of leucyl aminopeptidase and pyroglutamyl aminopeptidase from human skeletal muscle. *Clin Chim Acta* 197:35-45, 1991.

Martínez JM, Ramírez MJ, Prieto I, Alba F and Ramírez M: Sex differences and in vitro effects of steroids on serum aminopeptidase activities. *Peptides* 19: 1637-1640, 1998.

Martínez JM, Ramírez MJ, Prieto I, Petzelt C, Hermoso F, Alba F, Arias Saavedra JM and Ramírez M: Human serum pyroglutamyl- β -naphthylamide hydrolyzing activity during development and aging. *Arch Gerontol Geriatr* 28: 31-36, 1999.

Martínez JM, Prieto I, Ramírez MJ, Cueva C, Alba F and Ramírez M: Aminopeptidase activities in breast cancer tissue. *Clin Chem* 45: 1797-1802, 1999.

McKeon VA: The breast cancer prevention trial: should women at risk take tamoxifen? *J Obstet Gynecol Neonatal Nurs* 28: 34-38, 1999.

Mettlin C. Global breast cancer mortality statistics. *CA Cancer J Clin* 49:138-144, 1999.

Miller BA, Feuer EJ, Hankey BF. The increasing incidence of breast cancer since 1982: relevance of early detection. *Cancer Causes Control* 2:67-74, 1991.

Moriya T, Suzuki T, Pilichowska M, Ariga N, Kimura N, Ouchi N, Nagura H and

Sasanu H: Immunohistochemical expression of gonadotropin releasing hormone receptor in human breast carcinoma. *Pathol Int* 51: 333-337, 2001.

Nahta R, Hortobagyi GN and Esteva FJ. Novel pharmacological approaches in the treatment of breast cancer. *Expert Opin Investig Drugs* 12: 909-917, 2003.

Newcombe PA and Lantz PM: Recent trends in breast cancer incidence, mortality and mammography. *Breast Cancer Res Treat* 28: 97-106, 1993.

O'Higgins N. Aspects of breast cancers. *Chirurgie* 118:324-327, 1992.

Olsen MR and Love RR: Hormonal strategies for the prevention of breast cancer. In: Foon KA and Muss HB (Eds). *Biological and hormonal therapies of cancer* Kluwer Academic Publishers, Boston 1998.

Osborne CK, Boldt DH, Clark GM, Trent JM. Effects of tamoxifen on human breast cancer cell cycle kinetics: accumulation of cells in early G1 phase. *Cancer Res* 43:3583-3585, 1983.

Page DL, Dupont WD, Rogers LW, Rados MS. Atypical hyperplastic lesions of the female breast. A long-term follow-up study. *Cancer* 55:2698-2708, 1985.

Paradiso A, Pezzetta A, Cellamare G, Shittulli F, Marzullo F and Reskin SJ: GnRH receptors in human breast cancer and its contiguous not- involved breast tissue. *J Endocrinol Invest* 23: 90-96, 2000.

Pike MC, Spicer DV, Dahmouch L, Press MF. Estrogens, progestogens, normal breast cell proliferation, and breast cancer risk. *Epidemiol Rev* 15:17-35, 1993.

Powles TJ, Hickish T: Tamoxifen therapy and carcinogenic risk. *J Natl Cancer Inst* 87: 1343-1345, 1995.

Pritchard KI: Endocrine Therapy of advanced disease: analysis and implications of the existing data. *Clin Cancer Res* 9: 4605-4675, 2003.

Ramírez-Expósito MJ, García MJ, Mayas MD, Ramírez M and Martínez-Martos JM: El colesterol de la dieta modifica la actividad piroglutamil aminopeptidasa de la corteza frontal del ratón. *Diferencias sexuales Rev Neurol* 32: 904-907, 2001.

Rocheffort H, Bardon S, Chalbos D, Vignon F: Steroidal and nonsteroidal antiestrogens in breast cancer cells in culture. *J Steroid Biochem* 20: 105-110, 1984.

Rose DP, Pruitt B, Stauber P, Erturk E, Bryan GT. Influence of dosage schedule on the biological characteristics of N-nitrosomethylurea-induced rat mammary tumors. *Cancer Res* 40:235-239, 1980.

Rubinstein LV, Shoemaker RH, Paull KD, Simon RM, Tosini S, Skehan P, Scudiero DA, Monks A and Boyd MR: Comparison of in vitro anticancer-drug-screening data generated with a tetrazolium assay versus a protein assay against a diverse panel of human tumor cell lines. *J Natl Cancer Inst* 82: 1113-1118, 1990.

Ruiz de Almodovar JM, Nuñez MI, McMillan TJ, Olea N, Mort C, Villalobos M, Pedraza V and Steel GG: Initial radiation-induced DNA damage in human tumour cell lines: a correlation with intrinsic cellular radiosensitivity. *Br J Cancer* 69: 457-462, 1994.

Russo J, Calaf G, Russo IH. A critical approach to the malignant transformation of human breast epithelial cells with chemical carcinogens. *Crit Rev Oncog* 4:403-417, 1993.

Russo IH, Russo J. Role of hormones in mammary cancer initiation and progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 3:49-61, 1998.

Russo J, Gusterson BA, Rogers AE, Russo IH, Wellings SR, van Zwieten MJ. Comparative study of human and rat mammary tumorigenesis. *Lab Invest* 62:244-278, 1990.

Russo J, Hu YF, Silva ID, Russo IH. Cancer risk related to mammary gland structure and development. *Microsc Res Tech* 52:204-223, 2001.

Russo J, Russo IH. Biological and molecular bases of mammary carcinogenesis. *Lab Invest* 57:112-137, 1987.

Russo J, Hu YF, Yang X, Russo IH. Developmental, cellular, and molecular basis of human breast cancer. *J Natl Cancer Inst Monogr* 17-37, 2000.

Russo IH, Russo J. Mammary gland neoplasia in long-term rodent studies. *Environ Health Perspect* 104:938-967, 1996.

Santen RJ and Harvey H: Use of aromatase inhibitors in breast carcinoma. *Endocr Related Cancer* 6: 75-92, 1999.

Santen RJ, Manni A, Harvey H and Redmond C: Endocrine treatment of breast cancer in women. *Endocr Rev* 11: 1-45, 1990.

Schomburg L, Bauer K. Thyroid hormones rapidly and stringently regulate the messenger RNA levels of the thyrotropin-releasing hormone (TRH) receptor and the TRH-degrading ectoenzyme. *Endocrinology* 136:3480-3485, 1995.

Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D, Warren JT, Bokesch H, Kenney S and Boyd MR: New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J Natl Cancer Inst* 82: 1107-1112, 1990.

Valenzuela MT, Núñez MI, Villalobos M, Siles E, Olea N, Pedraza V, McMillan TJ and Ruíz de Almodóvar JM: Relationship between doxorubicin cell sensitivity, drug-induced DNA double-strand breaks, glutathione content and P-glycoprotein in mammalian tumor cells. *Anti-Cancer Drugs* 6: 749-757, 1995.

Villalobos M, Becerra D, Nuñez MI, Valenzuela MT, Siles E, Olea N, Pedraza V and Ruiz de Almodovar JM: Radiosensitivity of human breast cancer cell lines of different hormonal responsiveness. Modulatory effects of oestradiol. *Int J Radiat Biol* 70: 161-169, 1996.

Wilk S. Inhibitors of TRH-degrading enzymes. *Ann N Y Acad Sci* 553:252-264, 1989.

Yao K, Jordan VC. Questions about Tamoxifen and the Future Use of Antiestrogens. *Oncologist* 3:104-110, 1998.

Zajchowski D, Sajer R and Webster L: Estrogen inhibits the growth of estrogen receptor- negative, but not estrogen receptor- positive, human mammary epithelial cells expressing a recombinant estrogen receptor. *Cancer Res* 53: 5004-5011, 1993.

.oOo.