

**Efectos del 17 $\beta$ - estradiol sobre la  
expresión de la HSD17B5 en la línea  
celular de carcinoma de mama MCF-7**

José Daniel Jiménez Lacosta

Máster de Investigación en Ciencias de la Salud.

Septiembre 2012

D. Ignacio José Encío Martínez, Profesor Titular de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad Pública de Navarra,

EXPONE:

Que D. José Daniel Jiménez Lacosta, Licenciado en Químicas y Bioquímica por la Universidad de Zaragoza, ha realizado bajo su dirección el Trabajo de Fin de Máster que lleva por título "Efectos del  $17\beta$ -estradiol sobre la expresión de la HSD17B5 en la línea celular de carcinoma de mama MCF-7".

En Pamplona, a 20 de Septiembre de 2012

VºBº del Director del Trabajo.

Prof. Dr. D. Ignacio José Encío Martínez.

**Resumen.**

## **INTRODUCCIÓN.**

Los estrógenos son hormonas sexuales que cumplen sus efectos fisiológicos por su unión a receptores nucleares. Se ha descrito que su metabolismo se encuentra desregulado en diversos tumores como el de mama. Estos tumores son frecuentes en mujeres menopáusicas, en donde el nivel plasmático de estrógenos está disminuido. Esta evidencia sugiere una producción estrogénica intratumoral.

Una de las enzimas que participa en su biosíntesis es la 17  $\beta$ -deshidrogenasa de tipo 5. Esta enzima se expresa en varios tejidos, incluida la mama. Cataliza principalmente la reducción de androstenodiona a testosterona, aunque también puede reducir la estrona (E1) a estradiol (E2). Ambos casos pueden provocar un aumento en la concentración de la hormona y, por tanto, mayor efecto proliferativo. Esto la ha convertido en potencial diana terapéutica en los tumores en los que su regulación se encuentra alterada [1-3].

## **OBJETIVOS.**

Como es sabido, una hormona puede participar de la regulación de las enzimas que participan en los pasos clave de su formación. El E2 está implicado en el desarrollo de diversos tumores hormonodependientes, como el de mama. Entre las enzimas implicadas en su biosíntesis se encuentra la HSD17B5, por lo que era de especial interés evaluar su posible regulación por estrógenos en este tipo de tumores. Con este propósito nos planteamos:

1. Estudiar el efecto del E2 en la expresión de la HSD17B5 en células de cáncer de mama MCF-7.
2. Analizar si las acciones del E2 sobre la expresión de la HSD17B5 son mediadas por el ER $\alpha$
3. Analizar la actividad transcripcional del promotor de la HSD17B5 en células de cáncer de mama MCF-7.
4. Analizar si las acciones del E2 sobre la expresión de la HSD17B5 se producen a través de su promotor proximal.

## **MATERIAL Y MÉTODOS.**

- El efecto del E2 sobre los niveles de expresión de la HSD17B5 se analizó por PCR a tiempo real, en las líneas celulares MCF-7 y HepG2 en presencia y ausencia de un antiestrógeno.
- Para el análisis de la actividad promotora del gen *HSD17B5* se transfectaron células MCF-7 y HepG2 con plásmidos que contienen un gen quimérico formado por fusión de diferentes construcciones de la región promotora del *HSD17B5* con el gen de la luciferasa como gen reporter.
- Las condiciones generales de inducción del gen *HSD17B5* se estudiaron transfectando células MCF-7 con plásmidos que contenían diferentes construcciones de su promotor, y posterior tratamiento con forskolina, inductor inespecífico que eleva la concentración intracelular de cAMP.
- La acción del E2 sobre la actividad promotora del gen *HSD17B5* se evaluó transfectando células MCF-7 con los plásmidos que albergan las diferentes zonas del promotor a estudiar, y posterior tratamiento en presencia y ausencia del E2, un inhibidor específico para la hormona y un inductor inespecífico.

## **CRONOGRAMA DE EJECUCIÓN.**

Este trabajo se ha realizado durante 8 meses, a razón de 20 horas semanales. Las 4 primeras semanas se dedicaron al análisis informático del gen y búsqueda bibliográfica. En las siguientes 8 semanas se llevaron a cabo los experimentos de expresión génica mediante PCR a tiempo real. Los experimentos para el estudio de la actividad promotora del extremo 5' del gen *HSD17B5* se realizaron en las 6 semanas posteriores, mientras que las siguientes 12 semanas se utilizaron para los experimentos de transfección que permitieron estudiar la acción del E2 sobre la actividad promotora del gen de la HSD17B5. Las 4 últimas semanas se dedicaron al análisis de los resultados y redacción del presente trabajo.

**Índice.**

1. Introducción.....	1
1.1. Hormonas esteroideas.....	2
1.1.1. Estrógenos.....	2
1.1.1.1. Estructura.....	3
1.1.1.2. Síntesis.....	3
1.1.1.3. Metabolismo.....	5
1.1.1.4. Fisiología.....	6
1.1.1.5. Mecanismo de acción.....	7
1.1.1.5.1. Regulación del mecanismo de acción.....	9
1.1.2. Deshidrogenasas.....	10
1.1.2.1. La 17 $\beta$ -HSD de tipo 5.....	11
1.2. Tumores hormono-dependientes.....	12
1.2.1. Cáncer de mama.....	13
2. Objetivos.....	15
3. Material y métodos.....	17
4. Resultados.....	25
4.1. Efectos de la concentración de E2 sobre el nivel de expresión de HSD17B5 en la línea MCF-7.....	26
4.2. Dependencia del ER $\alpha$ en la represión por E2 de la expresión de la HSD17B5.....	27
4.3. Estudio de la actividad promotora del gen de la HSD17B5 en líneas celulares MCF-7 y HepG2.....	29
4.4. La actividad del promotor del gen HSD17B5 es inducible por cAMP en células MCF-7.....	31
4.5. Evaluación de la acción del E2 en la actividad promotora del extremo 5' del gen HSD17B5 en la línea celular MCF-7.....	32
5. Discusión.....	34
6. Conclusiones.....	38
7. Bibliografía.....	40

**ABREVIATURAS.**



HSD17B5 (AR1C3) = 17 $\beta$ -deshidrogenasa de tipo 5

E1 = estrona

E2 = estradiol

E3 = estriol

PCR = reacción en cadena de la polimerasa

ER = receptor de estrógenos

LDL (Low-density Lipoprotein) = Lipoproteína de baja densidad

CoA = coenzima A

HMGC<sub>o</sub>A = hidroximetilglutaril coenzima A

ACTH = hormona adrenocorticotropa

P = progesterona

DHEA = dehidroepiandrosterona

DHEA-S = sulfato de dehidroepiandrosterona

E1-S = sulfato de estrona

SHBG = globulina de unión a hormonas sexuales

ERE = elemento de respuesta a estrógenos

T = testosterona

DHT = dehidrotestosterona

PG = prostaglandina

ATCC = American Type Culture Collection

PBS = Phosphate Buffer Saline

EtOH = etanol

## **INTRODUCCIÓN.**

### 1.1. Hormonas esteroideas.

Dentro del grupo de moléculas que actúan como mensajeros intercelulares y que conocemos como hormonas nos encontramos con las hormonas esteroideas. Estas moléculas, desde el punto de vista estructural, son reguladores de una amplia variedad de procesos fisiológicos que incluyen cambios metabólicos, morfológicos y de comportamiento. Pueden clasificarse en cinco grandes grupos; mineralocorticoides, glucocorticoides, progestágenos, andrógenos y estrógenos [4]. Los dos primeros se conocen como **corticosteroides** ya que se sintetizan fundamentalmente en la corteza suprarrenal, mientras que al resto se les conoce con el nombre genérico de **esteroides sexuales**, ya que son actores principales en la reproducción y su lugar principal de producción son las gónadas.

Químicamente, todas tienen una estructura básica similar, basada en un núcleo formado por el ciclopentanoperhidrofenantreno (figura 1), pudiendo ser sintetizados a partir del colesterol (bien tomado del plasma a partir de las LDL o sintetizado *de novo* a partir del Acetil-CoA). Además, podríamos dividirlos, en función del número de carbonos que las componen, en tres grupos principales; C18 (estrógenos), C19 (andrógenos) y C21 (el resto).

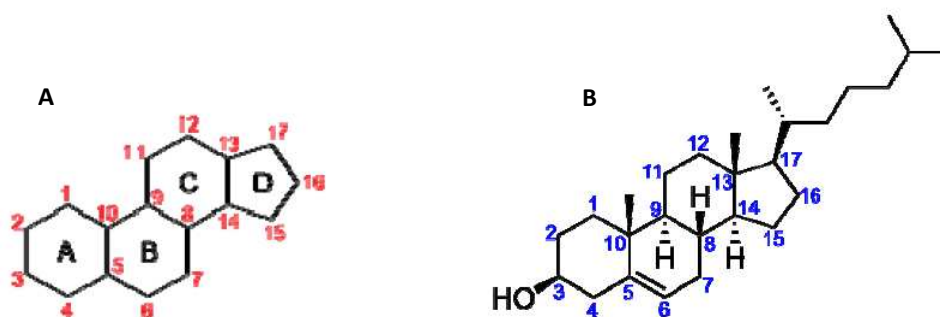


Figura 1 Estructura química numerada de las moléculas de Ciclopentanoperhidrofenantreno (A) y de Colesterol (B).

#### 1.1.1. Estrógenos.

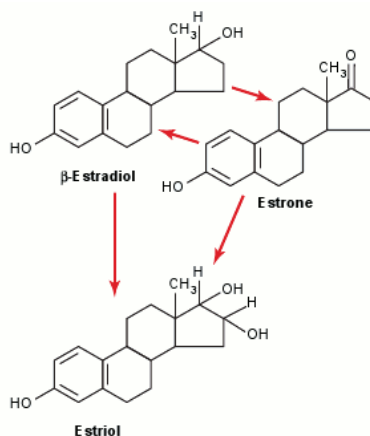
Este tipo de hormonas sexuales, conjuntamente con los progestágenos conocidos como hormonas femeninas al ser producidas en mucha mayor cantidad en la mujer, son

esenciales para la reproducción en mamíferos. Aunque se producen básicamente en los ovarios, los estrógenos circulan de manera sistémica y ejercen sus acciones selectivas en diferentes tejidos diana, mediadas por la presencia de receptores específicos para estrógenos [5].

Sólo existen tres estrógenos naturales que estén presentes en cantidades significativas en la mujer:  $\beta$ -estradiol (E2), estrona (E1) y estriol (E3), siendo el  $\beta$ -estradiol el secretado en mayor cantidad por los ovarios ya que la mayor parte de la estrona se forma en tejidos periféricos a partir de los andrógenos secretados por la corteza adrenal y las células de la teca en el ovario. Además, el poder estrogénico es mucho mayor en el E2 (12 veces el de la E1 y 80 veces el del E3) [6].

#### 1.1.1.1. Estructura.

Como se puede observar en la figura 2, los estrógenos son esteroides de 18 carbonos, con la característica distintiva de la presencia de un anillo fenólico en posición A y el C17 unido directamente a oxígeno. Este anillo aromático es fundamental para la unión de los estrógenos con su ER.



**Figura 2 Estructuras de los principales estrógenos naturales.** Las flechas en rojo indican las posibles interconversiones entre los mismos. *Adaptado de Guyton [6].*

#### 1.1.1.2. Síntesis.

Las enzimas esteroideogénicas son responsables de la biosíntesis a partir del colesterol de las diferentes hormonas esteroideas, entre las que se encuentran los estrógenos. Se sabe que están presentes en numerosos tejidos aunque su síntesis *de novo*

sólo se produce en los tejidos esteroideogénicos (corteza adrenal, gónadas y placenta). Estos tejidos pueden sintetizar el colesterol requerido a partir de acetato, si bien emplean principalmente el colesterol hepático, captado a partir de las LDL y almacenado en forma de ésteres que se hidrolizan por acción de la colesterol esterasa. De hecho, se sabe que una concentración adecuada de LDL inhibirá la HMGCoA reductasa de las células adrenales humanas, y que hormonas como la ACTH, entre otras acciones, estimulan a la enzima colesterol esterasa para que aumente la biodisponibilidad de colesterol libre.

La síntesis *de novo* de todas las hormonas esteroideas comienza con la conversión del colesterol en pregnenolona por la CYP11A o CSCC (colesterol side chain cleavage enzyme) [4, 7, 8], siendo la etapa limitante en la esteroideogénesis y principal sitio de regulación por la ACTH. La CYP11A se encuentra unida a la membrana interna mitocondrial de todos los tejidos esteroideogénicos, a donde llega el colesterol libre transportado por la proteína transportadora de esteroides 2 (SCP-2). Posteriormente, la pregnenolona puede ser transformada en 17-hidroxipregnenolona por la CYP17A1 o en progesterona (P) por la HSD3B5. Bien por uno u otro camino, podemos llegar a sintetizar todas las demás hormonas esteroideas, tal y como se puede apreciar en la figura 3.

Se puede observar que los últimos pasos en la biosíntesis de los esteroides implican la participación de una enzima aromatasa del grupo de las citocromo P450 oxidasas. Este paso clave consta de dos hidroxilaciones del metilo en posición 19 y una 3<sup>a</sup> hidroxilación en C2, con el resultado de la pérdida del metilo en C19 y la aromatización del anillo A del núcleo esteroideo.

Fuera de los tejidos esteroideogénicos no es posible la estrogénesis *de novo*, si bien hay tejidos periféricos en los que se pueden sintetizar a partir de la DHEA-S y la E1-S que llegan del torrente circulatorio. Para ello es necesario que en dichos tejidos se expresen las enzimas necesarias (sulfatasa, aromatasa, 17 $\beta$ -deshidrogenasa), además de la estrona sulfotransferasa, que catalizará el paso de E1 a E1-S para que pueda almacenarse hasta su posterior hidrólisis por la sulfatasa.

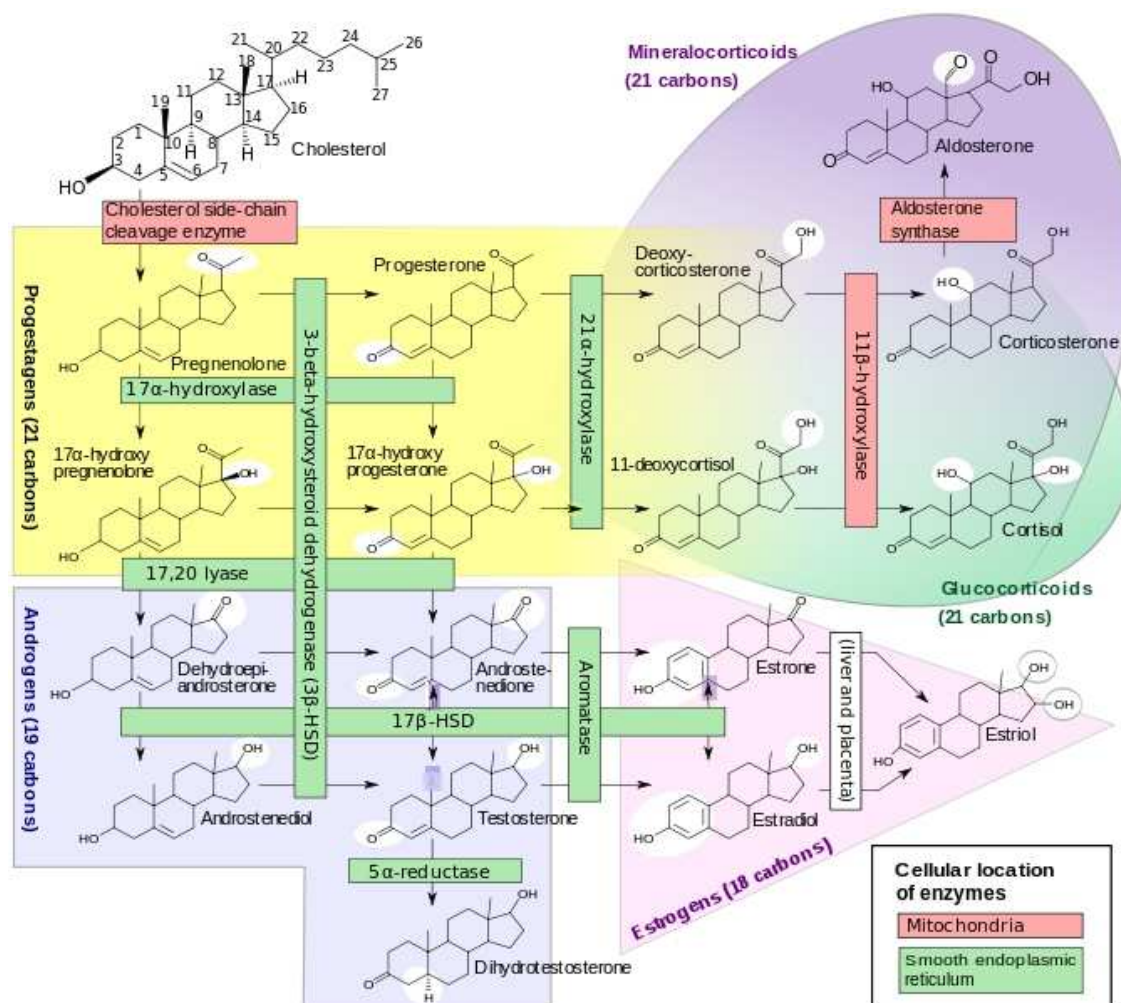


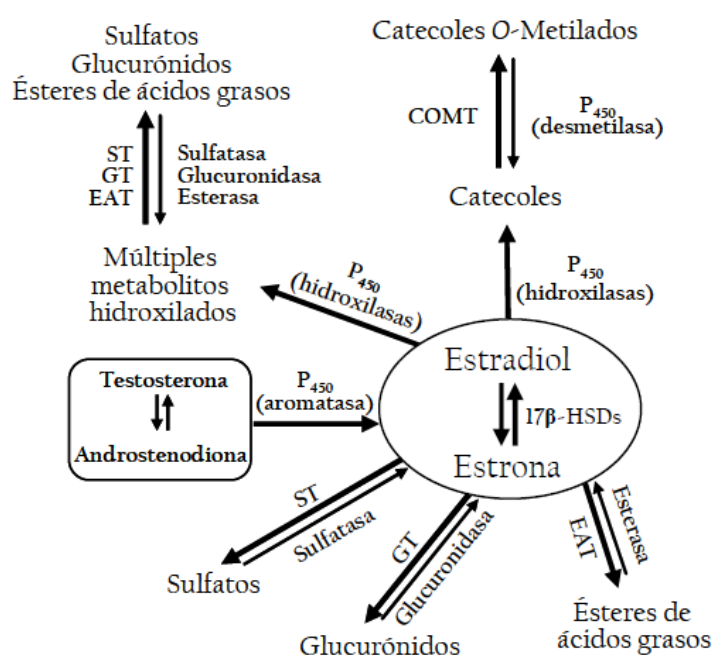
Figura 3. Rutas de biosíntesis de esteroides sexuales y corticosteroides.

### 1.1.1.3. Metabolismo.

Los estrógenos ejercen diversos efectos biológicos, actuando como potentes mitógenos en tejidos sensibles a hormonas como el útero y la mama, adonde llegan transportados por la sangre. Los estrógenos circulantes, debido a su naturaleza lipofílica, circulan unidos a proteínas plasmáticas, principalmente albúmina y globulina de unión a hormonas sexuales (SHBG), dejando una pequeña parte (2-3 % como forma libre).

Por otro lado, una exposición prolongada a la acción mitogénica de estrógenos naturales y sintéticos puede suponer un factor de riesgo en el desarrollo de determinados tipos de cáncer asociados a hormonas. Por tanto, deben establecerse mecanismos para su eliminación una vez que han cumplido su papel fisiológico [9].

Los estrógenos son eliminados por conversión en metabolitos solubles en agua, siendo excretados a través de la orina o de las heces (vía biliar). Entre los diferentes tipos de reacciones tenemos oxidaciones (fundamentalmente hidroxilaciones) y posterior conjugación con ácido glucurónico para aumentar su solubilidad, sulfonación y/o O-metilación (figura 4). Aunque la mayor parte del metabolismo oxidativo se lleva a cabo en el hígado, algunas isoformas de los citocromos P450 implicados pueden expresarse en tejidos extrahepáticos. Este hecho apoya la idea de que algunos de los metabolitos puedan ejercer acciones biológicas concretas, como son los casos del 4-hidroxiestradiol (carcinogénico) y 2-metoxiestradiol (antiangiogénico) [10].



**Figura 4. Metabolismo de los estrógenos.** (ST) sulfotransferasa, (GT) glucuroniltransferasa, (EAT) estrógeno-acetiltransferasa, (COMT) catecol-O-metiltransferasa, ( $P_{450}$ ) citocromo  $P_{450}$ .

#### 1.1.1.4. Fisiología.

La función principal de los estrógenos es provocar la proliferación y el aumento del tejido de los órganos sexuales y otros tejidos relacionados con la reproducción. Entre otros podemos destacar el crecimiento de la mucosa endometrial y su acondicionamiento para una óptima implantación del embrión, aumento del epitelio ciliar en las trompas de Falopio para favorecer el movimiento hacia el útero, así como el desarrollo del estroma, crecimiento de los conductos glandulares y depósito de grasa en las mamas [6].

Además de las clásicas acciones sobre el aparato reproductor, los estrógenos ejercen multitud de efectos en diferentes partes del cuerpo humano. Por ejemplo, inhiben la actividad osteoclástica en los huesos lo que explicaría el desarrollo de osteoporosis entre las mujeres menopáusicas.

Sobre el sistema cardiovascular ejercen un efecto protector, frenando la formación de placas de ateroma entre otras.

Por otro lado, los estrógenos ayudan a incrementar el metabolismo en general, aumentan los depósitos de grasa en tejido subcutáneo y tienen un cierto efecto en la retención de agua y sodio en los túbulos renales, contribuyendo a la retención de líquidos especialmente durante el embarazo.

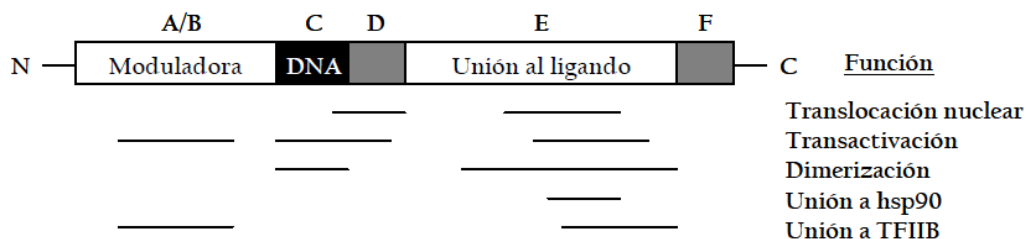
Importante es, también, su acción sobre el sistema nervioso ejerciendo efectos neurotróficos y neuroprotectores [11].

#### 1.1.1.5. Mecanismo de acción.

Los estrógenos, como los demás tipos de hormonas, ejercen sus efectos en la célula diana por interacción con sus receptores específicos. Se conocen dos tipos de ER a nivel intracelular y hay notables evidencias de la presencia de receptores de estrógenos en la membrana celular. El primer receptor de estrógenos descubierto fue el ER $\alpha$  a mediados de los 80. Una década después se descubrió el ER $\beta$ , con el que compartía una estructura de dominios común a los factores de transcripción modulados por ligando.

Los ER pertenecen a la **superfamilia de los receptores nucleares**, factores de transcripción entre los que también se incluyen los receptores para los demás esteroides sexuales, corticosteroides, hormona tiroidea, vitamina D, ácido retinoico y varios receptores *huérfanos* para los que no se ha encontrado todavía ligando. Todos ellos comparten una estructura común con 6 regiones homólogas, como se describe en la figura 5.





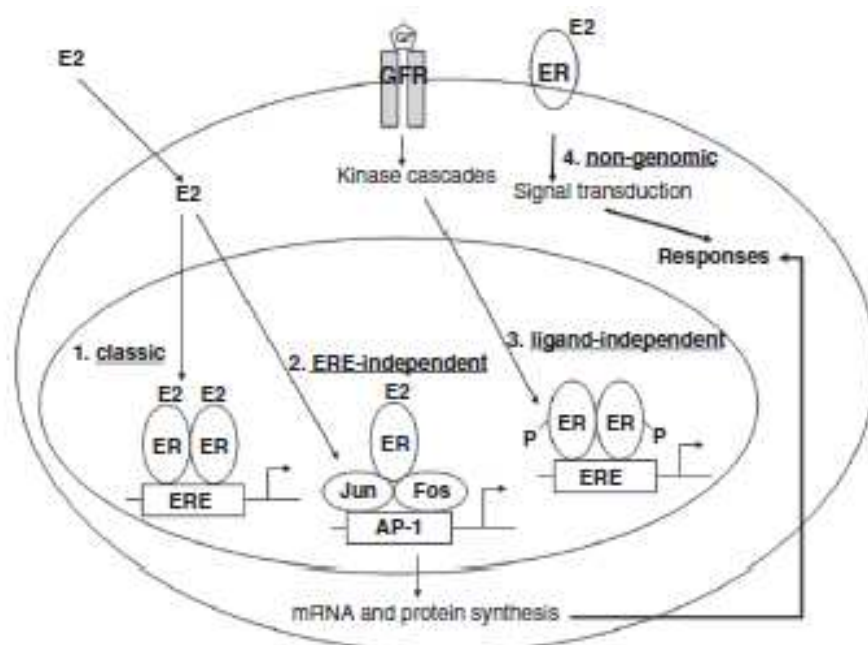
**Figura 5. Estructura y organización funcional de los receptores nucleares.** A/B, región transactivadora. C, dominio de unión a DNA. D, región bisagra. E, dominio de unión a hormona. F, región variable de función desconocida, no necesaria para la actividad del receptor. Figura adaptada de Peñuelas y Encío [12].

En cuanto a las **vías de señalización** en las que está implicado el ER, se han descrito al menos cuatro mecanismos moleculares (figura 6) por los que se puedan llevar a cabo las funciones biológicas correspondientes [13]:

- Ruta dependiente del ligando y de ERE (vía clásica); tras la unión de la hormona al receptor y posterior translocación al núcleo, el ER, activado en forma de dímero, contacta con una secuencia de DNA específica que contiene el elemento de respuesta a estrógenos (ERE), que consiste en un palíndromo perfecto con secuencia 5'-AGGTCAnnnTGACCT-3', lo que provoca el reclutamiento de la maquinaria de transcripción y la activación de los genes correspondientes.
- Ruta independiente de ERE; el complejo ER-E2 interacciona con otros factores de transcripción unidos a determinadas secuencias de DNA para poder completar la maquinaria de transcripción y que estos genes que no contiene EREs puedan expresarse. Este mecanismo se conoce comúnmente como *cross-talk* transcripcional. Hay varios genes como el de la ovoalbúmina, IGF-1, colagenasa y ciclina D1 que son activados por E2 a través de la unión de sus complejos ER-E2 con las proteínas Fos y Jun en las secuencias de DNA correspondientes a los sitios de unión a AP-1 [14]. NFκB y C/EBPβ son otros factores de transcripción cuya interacción con el ER se ha descrito [15].
- Ruta independiente de ligando; en ausencia de E2, otras rutas de señalización inducen la fosforilación de proteínas diana, entre las que se encuentra el ER. Una vez fosforilado (por ejemplo EGFR, receptor de insulina, PKA, PKC,...) el

receptor, es capaz de activar la expresión génica. Este mecanismo, especialmente el caso de ER y EGFR, es una de los principales mecanismos de resistencia a la terapia hormona en cáncer de mama.

- Vía no genómica; lo que explicaría la evidencia de que los estrógenos pueden ejercer acciones (movilización de calcio intracelular, activación de la ruta de las MAPK) tan rápidamente que no se explicarían por los mecanismos normales que implican transcripción genómica. Hay autores que proponen la existencia de una subpoblación de los ERs clásicos que estarían localizados en la membrana plasmática [16].



**Figura 6. Mecanismos de señalización del estrógeno y su receptor:** (1) En la ruta clásica, la unión del estrógeno provoca la dimerización y translocación del complejo E2-ER, para asociarse al ERE del promotor del gen diana y activar la transcripción; (2) En la ruta independiente del ERE, ER unido a la hormona activa la transcripción interactuando con otros factores de transcripción, como Jun/Fos; (3) Ruta independiente de ligando en la que un receptor de membrana asociado a quinasa es activado, provocando en última instancia la fosforilación del ER, lo que le permite activar genes diana en ausencia de su ligando; (4) ER asociados a membrana, al unirse el estrógeno, activan vías de señalización celular que no implican una respuesta genómica

#### 1.1.1.5.1. Regulación del mecanismo de acción.

Por todo lo comentado anteriormente, está claro que el mecanismo de acción de los estrógenos implica la participación de receptores específicos. Clásicamente se estudiaba la regulación de acción de los estrógenos en base al efecto que se podría ejercer sobre su receptor y que, en última instancia, provocaba la expresión génica y, por tanto, los efectos fisiológicos y/o patológicos sobre el organismo [14, 17]. Así pues, el ER se presentaría como una diana ideal para el diseño de fármacos que regulen la acción de los estrógenos según nuestro deseo, ya contienen cavidades internas que pueden ser ocupadas por moléculas hidrofóbicas de un volumen similar al de los fármacos. Sin embargo, la principal limitación de este tipo de terapia es que los estos receptores están involucrados en complejas rutas, pudiendo tener impacto en numerosos genes, lo que acarrearía efectos indeseables.

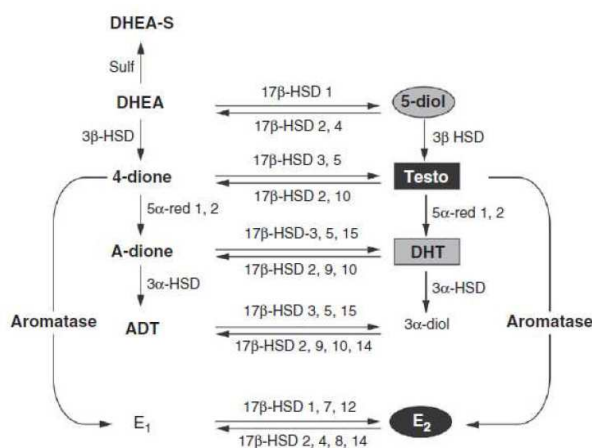
Por otra parte, aunque puede darse un mecanismo de acción independiente de ligando, en general consideramos la participación conjunta de hormona y receptor para producir el efecto deseado. Por tanto, es de suponer que se pueda actuar sobre la biodisponibilidad del ligando para poder manipular el resultado final. Es un enfoque diferente, que se conoce como regulación prerreceptor y que cada vez más está siendo el foco de atención de los investigadores.

#### 1.1.2. Deshidrogenasas.

La activación de las rutas de señalización de esteroides está controlada por la biodisponibilidad de la hormona correspondiente [18-21]. En los últimos pasos de la biosíntesis de los esteroides sexuales, así como en su metabolismo primario, juega un papel fundamental el grupo de enzimas conocidas como  $17\beta$ -deshidrogenasas ( $17\beta$ -HSD), que catalizan la oxidorreducción del carbono 17 de los esteroides C18 (estrógenos) y C19 (andrógenos) en una amplia variedad de tejidos. Con la excepción de la  $17\beta$ -HSD5, que es un miembro de la familia de las aldoceto-reductasas, todas las  $17\beta$ -HSDs pertenecen a la superfamilia de las deshidrogenasas/reductasas de cadena corta (SDR). Producen la interconversión entre las formas ceto (oxidadas y menos activas) e hidroxiladas (reducidas y más activas), como podemos observar en la figura 7 [18].

Se conocen hasta la fecha 14 isoformas de la  $17\beta$ -HSD en vertebrados, de las que 13 se han hallado en humanos. Difieren en su distribución en tejidos, localización subcelular, especificidad de sustrato y mecanismos de regulación. Además de su papel

fisiológico normal, hay un amplio conocimiento de su participación en la patogénesis de desórdenes humanos (como pueden ser el pseudohermafroditismo o la enfermedad del riñón poliquístico) además de procesos tumorales.



**Figura 7. Representación esquemática de la biosíntesis de esteroides en tejidos gonadales y periféricos.**

Las  $17\beta$ -HSD's se numeraron en orden cronológico según se iban descubriendo si bien podrían distinguirse dos categorías, según el tipo de reacción y cofactor que utilizan:

- Oxidantes; las tipo 2, 4, 8, 10, 11 y 14, que utilizan  $\text{NAD}^+$  como cofactor.
- Reductoras; las tipo 1, 3, 5, 7 y 12, que usan NADPH.

#### 1.1.2.1. $17\beta$ -HSD de tipo 5.

Como se ha podido comprobar al describir anteriormente las estructuras químicas de los esteroides sexuales, el E2 (principal estrógeno natural) puede obtenerse a partir de la aromatización de la T o de la reducción de la E1. Por otro lado, la T requerida se obtiene por reducción de la 4-Androstenodiona [22], reacción que es catalizada por la HSD17B3 en las células de Leydig de los testículos, distribuyéndose por todo el cuerpo a través del torrente sanguíneo y constituyendo una fuente endocrina de andrógenos. Sin embargo, este proceso puede darse en otros lugares como ovarios y tejidos extragonadales, si bien la isoforma implicada no es la  $17\beta$ -deshidrogenasa de tipo 3 sino la de tipo 5 (HSD17B5).

Esta enzima, también conocida como AKR1C3 ya que pertenece a la familia de las aldoceto-reductasas, posee también actividad 3 $\alpha$ -HSD pero en menor extensión. Presenta múltiples funciones; además de la transformación de la 4-androstenodiona en T, también es la responsable de la reducción de E1 en E2, P en 20 $\alpha$ -hidroxiprogesterona, DHT en androstanodiol (3 $\alpha$ -diol) y la transformación de PGD2 en PDF2 $\alpha$ .

La HSD17B5 se expresa ubicuamente, habiéndose detectado además del tejido gonadal, por ejemplo, en hígado, tejido adrenal, piel, próstata, útero, glándulas mamarias y pulmón.

El gen de la HSD17B5 abarca una extensión de 16 kb en la región cromosómica 10p15-p14. Contiene 9 exones que rinden un mRNA de 1,1 kb. La región 5' del gen presenta un promotor proximal sin caja TATA, aunque se ha demostrado que existen dos secuencias necesarias para la transcripción del gen que componen el promotor basal [23, 24]. Una se encuentra entre -65 y -58 bp y consta de una repetición CCT que constituye un sitio de unión para Sp1/Sp3 (corroborado por la disminución del mRNA de HSD17B5 al añadir mitramicina A, que inhibe los sitios de unión de Sp1 y Sp3 al DNA). La otra secuencia clave del promotor basal contiene un elemento rico en G en posición -24 a -9 al que se le une el factor de transcripción KLF15.

## 1.2. Tumores hormono-dependientes.

Además de los numerosos y variados efectos en diversos procesos fisiológicos, la acción de las hormonas esteroideas en general y de los estrógenos en particular es también ampliamente conocida en procesos patológicos en los cuales su metabolismo está desregulado. Destaca su implicación en tumores del aparato reproductor femenino.

Aunque estas enfermedades sean claramente dependientes de hormonas, las variaciones en las concentraciones de hormona circulante no explican los cambios observados en los tejidos enfermos. Una respuesta a esta evidencia nos la proporcionaría el concepto de **intracrinología** [7], por la cual se produciría una regulación de las concentraciones de hormona a nivel del tejido diana. Esto, a su vez, estaría mediado por la expresión de un determinado patrón de enzimas activadoras y

desactivadoras de los diferentes esteroides en los tejido diana proporcionando, de esta manera, un gradiente de concentración entre el torrente circulatorio y el tejido [25].

De hecho, los altos niveles intracelulares de hormona se conoce que son la causa de diversos cánceres de base endocrina, como los de mama, próstata, endometrio, ovario, cérvix, testículos, tiroides y osteosarcoma. La desregulación en la expresión de las enzimas esteroidogénicas en estos tumores parece ser la causa de un balance positivo de esteroides activos que se unen a sus correspondientes receptores nucleares, estimulando en última instancia la proliferación celular [26].

### 1.2.1. Cáncer de mama.

En relación a los estrógenos, ya hemos comentado su proceso de biosíntesis. Además, es ampliamente conocido que en algunos tipos de cáncer su producción está desregulada. Entre los más significativos y de especial incidencia entre la población femenina se encuentra el cáncer de mama, dándose la paradoja de que hay un gran porcentaje de casos en mujeres menopáusicas, en las que el nivel de estrógenos circulantes está disminuido. Sin embargo, a pesar de estos bajos niveles circulantes, las concentraciones de E1, E2 y sus sulfatos se encuentran elevadas considerablemente en el tejido tumoral, sugiriendo una biosíntesis tumoral que produciría la acumulación de dichas hormonas.

Aunque no puede desarrollar la esteroidogénesis *de novo*, hay evidencia de que el tejido mamario contiene toda la maquinaria enzimática necesaria para la biosíntesis local de E2 a partir de precursores circulante [2, 27, 28]. Se han descrito dos vías por la que se podría llevar a cabo:

- Ruta de la aromatasa, que transformaría andrógenos como androstenodiona, DHEA y DHEA-S en estrógenos.
- Ruta de la sulfatasa, que utilizaría el E1-S que le llegaría a la mama proveniente de los tejidos esteroidogénicos (básicamente el ovario en el caso de la mujer).

Independientemente de la vía que elija el tejido tumoral, siempre sería necesario la participación de 17-beta deshidrogenasas. Destacan la HSD17B1 y la HSD17B5. Esta última transforma principalmente la androstenodiona en T, aunque también podría reducir la E1 a E2, que obtendría vía sulfatasa. Posteriormente, la T se convertiría en E2

por medio de la aromatasa, lo que daría el aumento en la concentración intratumoral de E2 observado.

En nuestro laboratorio hay una amplia experiencia en el análisis de los mecanismos de control de la expresión de las HSD17Bs, habiéndose profundizado especialmente en las de tipo 8, 10 y 11 en células de hepatocarcinoma, adenocarcinoma de mama y adenocarcinoma de próstata y en su regulación por estrógenos y andrógenos [29-32]. También tenemos datos previos que indican que el E2 podría inhibir la expresión de la 17 $\beta$ -HSD de tipo 5 en células de mama [33]. Por tanto, nos es de especial interés evaluar la posible implicación de dicha enzima en el desarrollo de este tipo de tumor. Es por ello que una de las líneas de investigación consistía en el estudio del posible control por parte del E2 en la expresión de HSD17B5, implicada en su proceso de biosíntesis (mecanismo habitual en el control de la acción hormonal). Como eje principal de la investigación se plantea medir el efecto del E2 en el nivel de expresión de la enzima.

**OBJETIVOS.**



Un mecanismo básico del control de la acción hormonal es la regulación, por parte de la propia hormona, de alguna de las enzimas participantes en pasos claves de su síntesis. Entre las enzimas que participan en la biosíntesis y metabolismo primario de los esteroides sexuales se encuentran las 17 $\beta$ -deshidrogenasas de esteroides (17 $\beta$ -HSD). Este grupo de enzimas cataliza la óxidoreducción del carbono 17 de los esteroides C18 (estrógenos) y C19 (andrógenos) en una amplia variedad de tejidos, y participa por tanto en la regulación de los niveles de hormona en los tejidos diana al convertir 17 $\beta$ -hidroxiesteroides (activos) en 17-cetosteroides (inactivos) .

La acción del E2 está implicada en el desarrollo de diversos tipos de tumores hormonodependientes, entre los que se encuentra el cáncer de mama. En su biosíntesis intervienen diversas enzimas entre las que se incluyen varios tipos de 17 $\beta$ -HSDs, entre ellas la HSD17B5. Por tanto, el objetivo principal de este trabajo es evaluar la posible regulación por E2 de la HSD17B5 en células de cáncer de mama. Para ello, se propone:

5. Estudiar el efecto del E2 en la expresión de la HSD17B5 en células de cáncer de mama MCF-7.
6. Analizar si las acciones del E2 sobre la expresión de la HSD17B5 son mediadas por el ER $\alpha$
7. Analizar la actividad transcripcional del promotor de la HSD17B5 en células de cáncer de mama MCF-7.
8. Analizar si las acciones del E2 sobre la expresión de la HSD17B5 se producen a través de su promotor proximal.

## **MATERIALES Y MÉTODOS.**

### **3.1. Cultivo celular.**

En nuestros experimentos hemos utilizado dos líneas celulares, MCF-7 y CCRF-CEM. Las líneas se obtuvieron de la ATCC y cada una de ellas se ha mantenido cada una con su propio medio de mantenimiento. Para la línea celular MCF-7 se utilizó medio de cultivo RPMI-1640 (Invitrogen) que contiene L-Glutamina y HEPES 25mM como solución amortiguadora, mientras que para mantener las células HepG2 se usó medio de cultivo DMEM (Invitrogen) con Glutamax. Ambos medios se suplementaron al 10% con suero fetal bovino (Invitrogen) y se les añadió 100 unidades/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomicina, ambos de Invitrogen. Además, el suero fue previamente inactivado, manteniéndolo a 56 °C durante 30 minutos.

Los cultivos celulares eran conservados en una estufa a 37 °C, en una atmósfera con un 96% de humedad y 5% de CO<sub>2</sub>. Para el mantenimiento de dichos cultivos se utilizaron frascos de 75 mL (Nunc, Thermo Scientific, Rochester, NY, EEUU) mientras que los distintos experimentos se desarrollaron en placas de 6 y 24 pocillos.

#### **3.2.1. Preparación de suero sin esteroides.**

Como en nuestro trabajo pretendíamos estudiar la acción del estradiol, debíamos trabajar con medios que estuvieran suplementados con suero que estuviese libre de esteroides para evitar posibles interferencias. Para ello, a tubos de centrifuga de fondo cónico de 50 mL se añadieron alícuotas de 4 mL de una solución de 25 g de carbón activo (Sigma–Aldrich), 2,5 g de Dextrano T-500 (Amersham–Pharmacia, GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido), 10 mL de Tris–HCl 1 M de pH 7,4 y agua hasta 1 L. Los tubos se centrifugaron a 4.000 rpm durante 10 minutos a 4 °C, tras lo cual se desechó el sobrenadante y se añadieron 40 mL de suero por tubo sobre la mitad de los tubos, reservando la otra mitad para su posterior utilización.

El suero se mezcló con el carbón activo usando un agitador de noria durante 2 horas a 4 °C. Transcurrido este tiempo, se procedió a su centrifugación (4.000 rpm, 10 minutos, 4 °C), decantándose el sobrenadante sobre los tubos de reserva. Se volvieron a mezclar carbón activo y suero durante 2 horas a 4 °C y se repitió la centrifugación, esta vez decantando sobre tubos nuevos que se volvieron a centrifugar para eliminar posibles trazas de carbón.

Finalmente, el suero se esterilizó con un filtro de 0,2  $\mu\text{m}$  y se guardó congelado en alícuotas para su posterior utilización.

### **3.2. Transfecciones.**

Se llevaron a cabo por el método de lipofección, formando complejos entre lípidos catiónicos y el DNA que pretendemos introducir en la célula, en placas de 6 y 24 pocillos (BD Falcon, Reino Unido) usando medio sin antibióticos ya que podrían interferir en los experimentos de expresión génica.

#### **3.3.1. Subcultivo para las transfecciones.**

Veinticuatro horas antes de transfectar, las células se sembraron en placas de 24 pocillos a una densidad de 125000 células en 500  $\mu\text{L}$  de medio sin esteroides por pocillo para las placas de 24 pocillos. Para ello, primero se retiró el medio de cultivo de los frascos donde se mantienen las líneas celulares, se lavaron con PBS 1X, y se incubaron las células con 3 mL de tripsina-EDTA 0,25X durante 2 minutos a 37 °C, hasta que las células rompían sus puntos de unión con la superficie del frasco de cultivo. A continuación, se añadieron 7 mL de medio de cultivo suplementado con suero fetal bovino sin antibióticos para inactivar la tripsina, se recogió todo el volumen en un tubo de 15 mL (Falcon) y se centrifugó durante 10 minutos a 1.500 rpm para eliminar la tripsina del medio. Por último, se resuspendió el precipitado celular en 2 mL de medio completo y se hizo un recuento celular utilizando una cámara de Neubauer. De este modo, se sembró el número deseado de células por pocillo en un medio suplementado con suero fetal bovino al 10% y sin antibiótico.

#### **3.3.2. Formación del complejo lípido-DNA.**

La formación de los complejos lípido/DNA se llevó a cabo con Lipofectamine 2000 de la siguiente manera:

- Se diluye el DNA exógeno en el volumen adecuado de Opti-MEM® I Reduced SERUM medium (Invitrogen). Por otra parte, se diluye el volumen adecuado de Lipofectamine 2000 (Invitrogen) en la misma cantidad de Opti-MEM® I Reduced SERUM medium. Las mezclas se incuban durante 5 minutos a

temperatura ambiente. A continuación se mezclan ambas preparaciones y se prosigue la incubación durante 20 minutos a temperatura ambiente.

- El complejo lípido–DNA se añade gota a gota sobre las células, tratando de distribuirlo homogéneamente por agitación suave de la placa.
- Tras un periodo de incubación de 4 horas a 37 °C en una atmósfera con un 96% de humedad relativa y un 5% de CO<sub>2</sub>, se sustituye el medio por uno nuevo y se continúa la incubación en las mismas condiciones hasta que se cumplan las 24 horas desde la transfección.

### **3.3.3. Medida de la actividad luciferasa.**

La medida de actividad luciferasa se llevó a cabo mediante el sistema Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega), que permite medir las unidades de luz relativas emitidas por la luciferasa de *Photinus pyralis* y de *Renilla reniformis*.

En los experimentos de transfección se usaron plásmidos que tenían genes quiméricos en los que el gen de la luciferasa de *Photinus pyralis* estaba bajo el control de diversas construcciones del promotor de la HSD17B5. Este gen que usamos como gen reporter también se encuentra en los plásmidos pGL3-Basic y pGL3-Promoter que hemos usado como controles negativo y positivo de los experimentos, respectivamente. En nuestros experimentos se cotransfecta otro plásmido con el vector de expresión de la luciferasa de *Renilla reniformis*. Éste último plásmido permite la expresión constitutiva de la luciferasa de *Renilla reniformis* y como ambos plásmidos se introducen en las mismas células, la comparación de la luz emitida por ambas luciferasas permite obtener un valor relativo de actividad normalizado en función de la eficiencia de la transfección.

En nuestro protocolo, transcurridas 24 horas de la transfección se lavaron los pocillos con PBS 1X (Invitrogen), se incubaron durante 15 minutos en agitación con 100 µL por pocillo de Passive Lysis Buffer 1X (Promega). A continuación, se recogieron los sobrenadantes y se centrifugaron durante 2 minutos a 13.000 rpm, con el fin de poder apartar las membranas celulares. El lisado proteico se transfirió a nuevos tubos (Eppendorf) para evitar que los restos celulares pudieran interferir en la medición de la actividad luciferasa.

Para llevar a cabo la medida de actividad luciferasa primero se mezclaron 20  $\mu$ L de lisado proteico con 100  $\mu$ L de la solución Luciferase Assay Reagent II (LARII) y se hizo la primera medida que correspondía a la actividad luciferasa de *Phonitus pyralis*. A continuación, se añadieron 100  $\mu$ L de solución Stop&Glo Reagent, realizando una segunda medición, ahora correspondiente a la actividad luciferasa de *Renilla reniformis*. Cada una de las medidas se hizo por duplicado.

### **3.3.4. Medida de la cantidad de proteína por el método de Bradford.**

Los resultados de actividad luciferasa se muestran en unidades de luz relativas por microgramo de proteína, por lo que es necesario medir la concentración de proteína total recogida en cada lisado proteico tras las transfecciones para una correcta normalización de las mediciones.

Para cuantificar las proteínas se utilizó el sistema BioRad Protein Assay (BioRad Laboratories Inc.), basado en el método colorimétrico de Bradford. Este método se basa en la unión de un colorante (Comassie Blue G-250) a las proteínas, dando lugar a unos complejos proteína-colorante de color azul y cuyo máximo de absorción se da a una longitud de onda de 595 nm. Posteriormente, con la ayuda de una recta patrón obtenida a partir de concentraciones de proteína conocidas, se cuantifica la de la proteína problema.

Para la recta patrón se usaron disoluciones de concentraciones conocidas de albúmina sérica bovina (BSA) (Pierce, Thermo Scientific). Las mediciones a 595 nm se realizaban tras mezclar 20  $\mu$ L de los estándares o de las muestras con 200  $\mu$ L del colorante diluido 5 veces en agua destilada.

## **3.3. Extracción de ácidos nucleicos.**

### **3.4.1. Extracción del RNA.**

Para la extracción del RNA total de las células de nuestros experimentos se utilizó el Kit RNeasy Mini (Qiagen). Tras dejar que las células alcanzaran un 75–80% de confluencia, se les retiró el medio de cultivo por aspiración, lavándose con PBS 1X. Las células se incubaron con la cantidad adecuada de Tripsina–EDTA 0,25X para posteriormente despegarlas del frasco con pequeños golpes, tras lo cual se añadió

medio de cultivo completo para neutralizar el efecto de la tripsina y se centrifugaron a 1.500 rpm durante 5 minutos. Tras decantar el sobrenadante se realizaron dos lavados con PBS 1X, y se centrifugó a 13.000 rpm durante 5 minutos. A continuación se resuspendió el precipitado de células en 350  $\mu$ L de tampón RLT, suministrado en el kit, al que previamente se había añadido un 10% de  $\beta$ -mercaptoetanol. Tras la disrupción completa de las células, el lisado se homogeneizó usando minicolumnas QIAshredder (Qiagen) y centrifugando a 13.000 rpm durante 2 minutos. Ésta y las sucesivas centrifugaciones se realizaron a una temperatura de entre 20 y 25 °C, evitando siempre temperaturas inferiores a los 20 °C. A continuación, se añadieron sobre el lisado 350  $\mu$ L de etanol al 70% y se mezcló bien con ayuda de la pipeta. La muestra se transfirió sobre una columna RNeasy y se centrifugó durante 15 segundos a 10.000 rpm. El RNA adherido a la columna se lavó sucesivamente con 700  $\mu$ L de la solución tampón RW1 (10.000 rpm, 15 segundos), 500  $\mu$ L del tampón RPE (10.000 rpm, 15 segundos) y 500  $\mu$ L del tampón RPE (10.000 rpm, 2 minutos). Finalmente, se depositó la columna en un nuevo tubo de 2 mL y se centrifugó en seco durante 1 minuto a 13.000 rpm para eliminar posibles trazas de etanol que contiene el tampón RPE. El RNA total se eluyó con 30–50  $\mu$ L de agua libre de RNasas centrifugando 1 minuto a 10.000 rpm. Las muestras se guardaron inmediatamente a –80 °C para evitar la degradación del RNA.

#### **3.4.2. Extracción de DNA plasmídico (midipreparaciones de DNA).**

La obtención del DNA plasmídico empleado en las transfecciones se llevó a cabo con el Qiagen Plasmid Midi Kit (Qiagen). Previamente se crecieron bacterias que contenían el plásmido que íbamos a utilizar en las transfecciones. El protocolo se describe brevemente a continuación:

- Se inocularon 2 mL de medio de cultivo LB–ampicilina (concentración final de ampicilina 0,1 mg/mL) con una colonia aislada y se incubaron con agitación intensa a 37 °C durante 8 horas. A continuación, se diluyó 1:500 en nuevo medio LB–ampicilina (VF = 100 mL) y se prosiguió la incubación a 37 °C con agitación intensa durante 16 horas.
- Se recogieron las células por centrifugación (6.000 g, 4 °C, 15 minutos) y se resuspendieron en 4 mL de tampón P1. Se añadieron 4 mL de tampón P2 y, tras mezclar por inversión 5–6 veces, se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos. A continuación se añadieron 4 mL de tampón P3 enfriado previamente

a 4 °C, se mezcló inmediatamente por inversión y se incubó en hielo durante 15 minutos.

- El tubo se centrifugó a 20.000 g y 4 °C durante 30 minutos. Seguidamente, se recogió el sobrenadante en un tubo nuevo y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones durante 15 minutos.
- Durante la centrifugación se equilibró una columna de silicagel Qiagen TIP-100 añadiendo 4 mL de tampón QBT y dejando que se vaciara por gravedad. Una vez equilibrada, se añadió el sobrenadante de la centrifugación sobre la columna y se lavó la columna con 10 mL de tampón QC. El lavado se realizó por duplicado.
- El DNA se eluyó con 5 mL de tampón QF recogiéndolo en un tubo de propileno de 50 mL, se precipitó con isopropanol, se lavó con etanol al 70%, se secó al aire y se resuspendió en 250 µL de agua estéril. La concentración de DNA plasmídico se midió con la ayuda del Picodrop Microlitre Spectrophotometer Version 1.07 (Picodrop, Saffron Walden, Reino Unido).

### **3.4. RT-qPCR.**

En esta técnica tenemos una primera reacción de retrotranscripción a partir de ARN, seguida de una PCR a tiempo real con el cDNA obtenido.

Para la retrotranscripción del ARN se empleó retrotranscriptasa AffinityScript Multiple Temperature Reverse Transcriptase (Stratagene, La Jolla, CA, EE.UU.). En primer lugar, se mezclaron 300 ng de hexámeros con 1000 ng de ARN para un volumen final de 14.2 L, incubándose 5 minutos a 65 °C y 10 minutos a 25 °C. A continuación, se añadieron 2 L de DTT 100 mM, 0,8 L de dNTP 100 mM, 2 L del tampón AffinityScript RT 10X y 1 L de la enzima AffinityScript Multiple Temperature Reverse Transcriptase. Esta mezcla se incubó primero a 25 °C durante 10 minutos y luego 1 hora a 55 °C. Por último, con el fin de inactivar la enzima, se incubaron las muestras a 70°C durante 15 minutos. Estas retrotranscripciones se llevaron a cabo en un termociclador Peltier Thermal Cycler PTC-200 (MJ Research, Bio-Rad Laboratories Inc.).



La determinación de los niveles de expresión de la 17 $\beta$ -deshidrogenasa de tipo 5 se llevó a cabo por PCR a tiempo real, cuantificándose la expresión relativa de esta enzima en relación con la expresión de la  $\beta$ -actina, cuyo gen se expresa de manera constitutiva. El agente intercalante empleado fue el SYBR Green I (Takara, Japón), un fluorocromo capaz de emitir fluorescencia cuando se une al ADN de doble hebra. Al medir la intensidad de fluorescencia emitida durante la amplificación de cada ciclo de la PCR, se obtiene la cuantificación de los productos de PCR. Las amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador Chromo-4 (MJ Research). Tras registrar los datos, se analizaron con el programa Opticon Monitor.

Para llevar a cabo las reacciones de la PCR a tiempo real, se cargaron los pocillos de una placa de 96 con 20 ng del cDNA correspondiente, 1  $\mu$ L de cada uno de los cebadores a concentración 5  $\mu$ M y SYBR Premix Ex Taq (2X). Se cargaron también algunos pocillos con agua con el fin de usarlos como control negativo. Las condiciones térmicas de cada ciclo de la PCR fueron 30 segundos a 95 °C para la desnaturalización del ADN y otros 30 segundos a 60 °C para su emparejamiento y extensión. Se repitió durante 40 ciclos previa desnaturalización inicial de 10 minutos a 95 °C.

### **3.5. Análisis estadístico.**

El análisis estadístico se realizó con el programa SPSS versión 15.0 para Windows. El estudio de normalidad para la distribución de las muestras se realizó mediante las pruebas de normalidad de Shapiro–Wilks y Kolmogorov–Smirnov. Para hallar diferencias estadísticas en cada experimento se usaron las pruebas T si la distribución era normal. En las muestras que no lo eran se usó el test de la U de Mann-Whitney si son muestras independientes o el test de Wilcoxon en el caso de muestras apareadas, como sería el caso de las células tratadas con E2 o sin tratar. En todos los casos se consideró como diferencias estadísticamente significativas una  $p < 0,05$  y  $p < 0,001$  para niveles de significación del 5% y 1%, respectivamente.

**RESULTADOS.**

#### 4.1. Efecto del estradiol sobre la expresión de la HSD17B5 en la línea celular MCF-7.

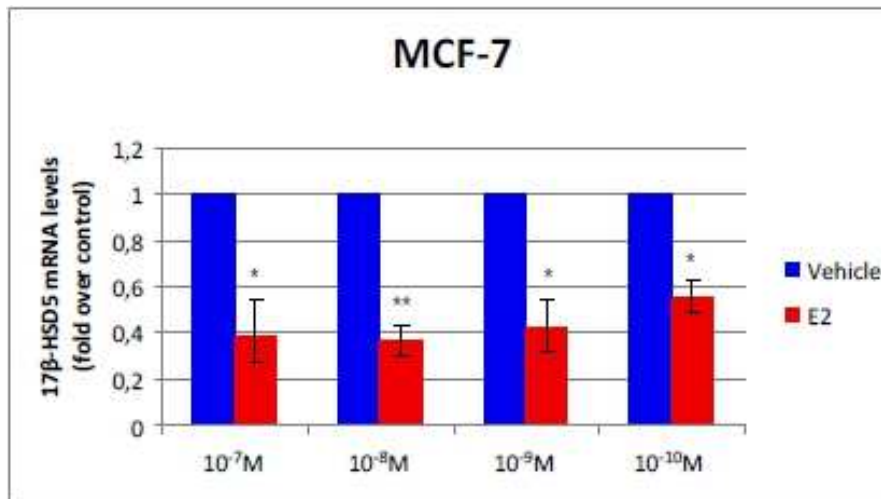
En experimentos previos en nuestro laboratorio se evidenció que el E2 reprimía la expresión de la HSD17B5 en células MCF-7, línea celular de cáncer de mama sensible a estrógenos ya que expresa de manera constitutiva la isoforma alfa del receptor de estrógenos [33]. Por tanto, era de interés abordar el estudio de la regulación de este gen por estrógenos.

Un primer paso era determinar la concentración de estrógeno más apropiada para evaluar dicha regulación. Para ello se sembraron, en placas de 6 pocillos, 750000 células por pocillo. Tras 24 horas se retiró el medio, se lavaron las células con PBS y se sustituyó el medio de cultivo por otro sin esteroides. Después de una hora de incubación se reemplazó nuevamente este medio por otro sin esteroides al que se le había añadido E2 a concentraciones  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-9}$  ó  $10^{-10}$ M (para los pocillos que se usaron como control en lugar de E2 se añadió EtOH, usado como vehículo a la hora de disolver el E2). Transcurridas 24 horas de incubación con E2, se tripsinizaron las células, se extrajo el RNA, midiéndose por PCR a tiempo real el nivel de expresión de la HSD17B5. Los resultados, normalizados con respecto a los niveles de expresión del gen de la  $\beta$ -actina (ACTB) que usamos como control interno, se relativizaron en relación al cociente HSD17B5/ACTB correspondiente a las células sin tratar, y al que se le dio el valor de 1. Las secuencias de los *primers* utilizados en las reacciones de PCR son (secuencias 5'-3'):

- Para la HSD17B5:
  - Hebra superior: CGGAGTAAATTGCTAGATTTTC
  - Hebra inferior: GACTGGGTCCTCCAAGAG
- Para la ACTB: se empleó una pareja de cebadores comerciales (referencia PPH00073E200 de SABiosciences, Qiagen).

Se hicieron 6 experimentos independientes, por triplicado.

Los datos reflejados en la figura 8 muestran que la disminución más importante en la expresión de la HSD17B5 se obtiene a concentración fisiológica ( $10^{-8}$ M), mientras que tanto en condiciones suprafisiológicas ( $10^{-7}$ M) como infra fisiológicas ( $10^{-9}$ M y  $10^{-10}$ M) también se reprimía la expresión de dicho gen, pero en menor extensión.



**Figura 8. Efecto de la concentración de E2 sobre la expresión del gen HSD17B5 en células MCF-7.** Se midió por PCR a tiempo real el nivel de expresión de mRNA del gen HSD17B5 en células MCF-7 tratadas con diferentes concentraciones de E2. Los resultados (media  $\pm$  SEM) se calcularon relativizándolos con respecto a los niveles de expresión del control interno ACTB, dando posteriormente el valor de 1 al cociente HSD17B5/ACTB en células sin tratar (control). Los asteriscos representan diferencias estadísticamente significativas de las células tratadas con hormona respecto a las células sin tratar (\*,  $p \leq 0,05$ ; \*\*,  $p \leq 0,01$ ;  $n = 6$ )

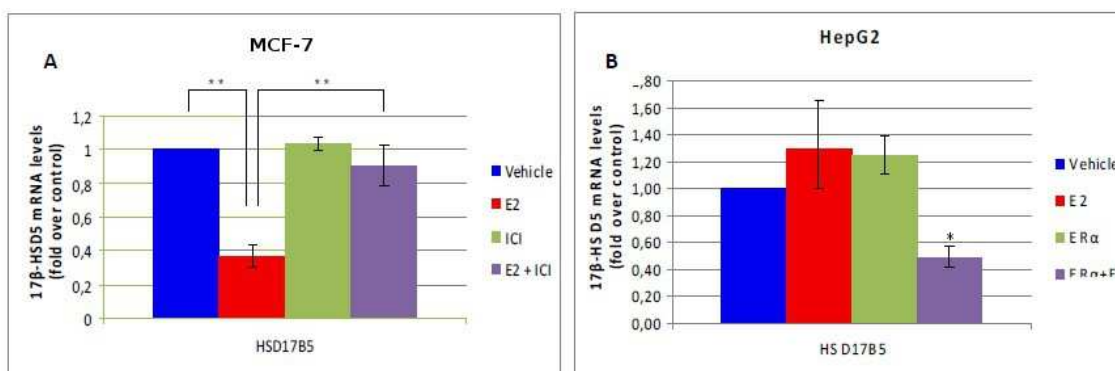
#### 4.2. Dependencia del ER $\alpha$ en la represión por E2 de la expresión de la HSD17B5.

Es ampliamente conocido que el E2 ejerce sus efectos en la célula a través de su unión al receptor de estrógenos. Para constatar la implicación del ER junto al E2 en los resultados obtenidos, se diseñó un experimento en el que se trataron células MCF-7 con E2 10<sup>-8</sup>M tanto en ausencia como en presencia de ICI182780 (fulvestrant) 10<sup>-7</sup>M, que es un antagonista puro de la acción estrogénica al bloquear su receptor [34]. También se adicionó el inhibidor solo, con el fin de poder evaluar cualquier acción intrínseca del mismo, independiente de la presencia o no de E2, sobre la expresión de HSD17B5.

Al igual que en el experimento anterior, se sembraron 750000 células MCF-7 por pocillo. Tras 24 horas de incubación, se lavaron las células con PBS, cambiando a medio sin esteroides que, una hora después fue sustituido por nuevo medio sin esteroides ahora con E2 10<sup>-8</sup>M, con ICI 10<sup>-8</sup>M, con ambos a la vez o sólo con el vehículo (células control). En los experimentos en los que se adicionaron conjuntamente hormona e inhibidor, se añadió en primer lugar el ICI182780 y, tras media hora de incubación se añadió el E2. Pasadas 24 horas se continuó como en el apartado anterior para realizar las medidas de los niveles de expresión. Se hicieron 5 experimentos

independientes por triplicado. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 9.A. La figura muestra que el tratamiento con E2 reduce alrededor del 65% la expresión de la HSD17B5 en células MCF y también que el ICI182780 suprime el efecto del E2.

Para confirmar la implicación del ER en la inhibición de la expresión de la HSD17B5 por E2, a continuación se trataron células HepG2, que no expresan receptor de estrógenos, con E2. Los tratamientos se realizaron tanto en células que fueron previamente transfectadas con pHEO (vector de expresión del ER $\alpha$ ) como en otras en las que no se introdujo este plásmido y, por lo tanto, no disponían del ER. Por tanto, tras sembrar las 750000 células por pocillo e incubarlas 24 horas, en los experimentos en los que era necesaria la participación del ER $\alpha$  se llevó a cabo una transfección previa con el plásmido pHEO 24 horas antes de iniciar los tratamientos. Las transfecciones se hicieron con *Lipofectamine 2000*, en placas de 6 pocillos, empleándose 2  $\mu$ g de pHEO por pocillo y en un medio libre de esteroides. Una vez transcurridas las 24 horas, se lavaron las células y se cambió a medio sin esteroides que una hora más tarde fue cambiado por otro nuevo con el E2 o con vehículo si no era preciso añadir el estrógeno. Tras 24 horas de incubación se procedió a la tripsinización de las células y medidas de PCR como en experimentos anteriores. Como en el caso anterior, se hicieron 5 experimentos independientes por triplicado. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 9.B. La figura muestra la necesaria presencia tanto de E2 como de ER para producir el efecto esperado. Ambos experimentos confirman, por tanto, que el descenso inducido por el E2 en el nivel de expresión del gen de la HSD17B5 es mediado por su receptor.



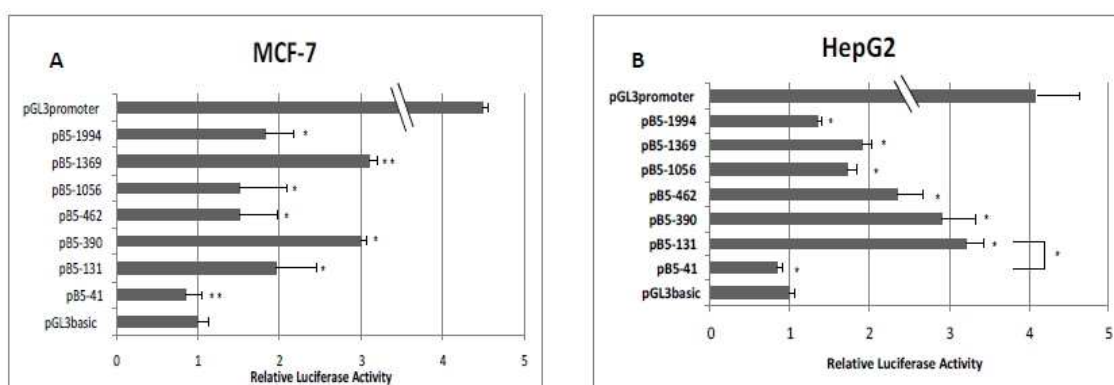
**Figura 9. La represión por E2 de la expresión del gen de la HSD17B5 en líneas celulares MCF-7 y HepG2 depende del ER $\alpha$ .** Se midió por PCR a tiempo real el nivel de expresión de mRNA del gen HSD17B5 en células MCF-7 (A) tratadas con E2 y/o ICI, y HepG2 (B) transfectadas o no con un vector de expresión del ER y tratamiento o no con E2. Los resultados (media  $\pm$  SEM) se calcularon relativizándolos con respecto a los niveles de expresión del control interno ACTB, dando posteriormente el valor de 1 al cociente HSD17B5/ACTB en células sin tratar (control). Los asteriscos representan diferencias estadísticamente significativas de las células tratadas con hormona respecto a las células sin tratar (\*,  $p \leq 0,05$ ; \*\*,  $p \leq 0,01$ ;  $n = 5$ ).

#### 4.3. Estudio de la actividad promotora del gen de la HSD17B5 en líneas celulares MCF-7 y HepG2.

Para evaluar la implicación del promotor de la HSD17B5 en los resultados obtenidos anteriormente, se analizó a continuación si el extremo 5' del gen HSD17B5 es un promotor funcionalmente activo en células MCF-7 y HepG2. Con este fin se analizó la actividad transcripcional en estas líneas de diversas construcciones quiméricas constituidas por fragmentos de diferente longitud del extremo 5' del gen de la HSD17B5 fusionados con el gen de la luciferasa de *Photinus pyralis* (gen empleado como gen de referencia). Todos los fragmentos del extremo 5' del gen HSD17B5 tenían un extremo común en el nucleótido +45 y el otro extremo en el nucleótido -41, -131, -390, -462, -1056, -1369 o -1994 del gen [33].

En los experimentos de transfección, tras sembrar 150000 células por pocillo e incubarlas durante 24 horas, las células se cotransfectaron con 0,5  $\mu$ g de la construcción a analizar y 1 ng del vector de expresión de la luciferasa de *Renilla reniformis* (usado como control interno de eficiencia de la transfección) con *Lipofectamine* 2000. Además

de las construcciones basadas en el extremo 5' del gen de la HSD17B5, también se cotransfectaron los plásmidos pGL3-Basic y pGL3-Promoter que fueron usados como controles negativo y positivo del experimento, respectivamente. Las células transfectadas se incubaron 24 horas, tras lo cual se lisaron, procediéndose a la medición de la actividad luciferasa de cada construcción y normalización de los resultados respecto a la actividad *Renilla* y a la cantidad de proteína total, expresada en  $\mu\text{g}$  y medida por el método de Bradford. Los resultados se relativizaron con respecto al control negativo, al que se le dio el valor de 1 y se muestran en las figuras 10.A y 10.B.



**Figura 10. El extremo 5' del gen HSD17B5 tiene actividad promotora en líneas celulares MCF-7 (A) y HepG2 (B).** Se muestran las actividades luciferasa de las construcciones que contienen diferentes fragmentos del promotor de la HSD17B5, normalizadas con respecto a la actividad de la *Renilla* usada como control de eficiencia de la transfección así como de la cantidad de proteína total en el ensayo, tanto en células MCF-7 (A) como HepG2 (B), además de los plásmidos pGL3-Basic y pGL3-Promoter como controles negativo y positivo, respectivamente, del experimento. En ambas líneas celulares se relativizaron dichas actividades normalizadas con respecto al control negativo, al que se le dio el valor de 1. Los asteriscos representan diferencias estadísticamente significativas de las distintas construcciones con respecto al control (\*,  $p \leq 0,05$ ; \*\*,  $p \leq 0,01$ ;  $n = 4$ ).

Como puede apreciarse al examinar ambas figuras, el promotor de la HSD17B5 es funcionalmente activo en ambas líneas celulares, en las que se comporta como un promotor débil ya que las diferentes construcciones muestran cierta actividad pero bastante menor que la del plásmido pGL3-Promoter, que contiene el promotor del SV40 (se sabe que se expresa de manera constitutiva en células eucariotas). Además, los resultados indican que la región comprendida entre los nucleótidos -41/+45 del gen carece de actividad transcripcional, mientras que el fragmento comprendido entre los nucleótidos -131/-41 es necesario para dirigir la transcripción y suficiente para alcanzar valores de actividad máximos en ambas líneas celulares, por lo que puede decirse que contiene los elementos promotores mínimos del gen.

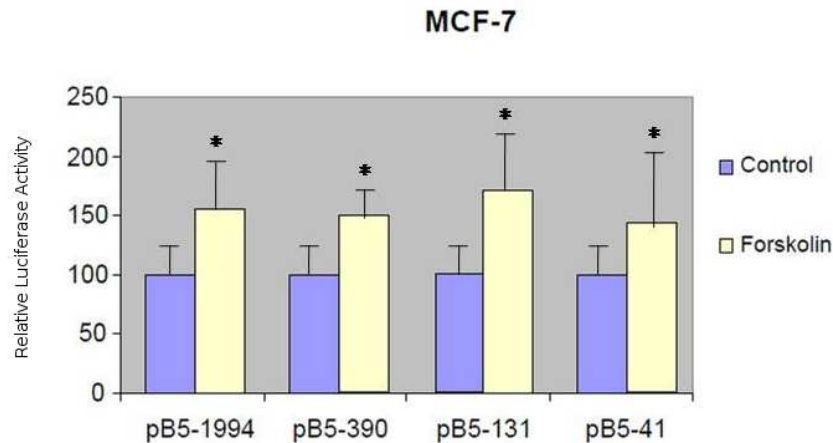
#### 4.4. La actividad del promotor del gen HSD17B5 es inducible por cAMP en células MCF-7.

La producción de las hormonas sexuales está regulada por el eje hipotalámico-hipofisario. Así, mientras la secreción de testosterona por las células de Leydig es estimulada por la LH, la formación de E2 en el ovario requiere la presencia tanto de LH como de FSH. Estas hormonas actúan a través de receptores de membrana ligados a proteínas G, cuya activación resulta en la acumulación de cAMP y se ha sugerido que el cAMP podría inducir la expresión de la HSD17B5 en células de próstata a través de un motivo de unión a Sp1/Sp3 localizado en su promotor proximal [26, 35].

Por ello, puesto que el promotor de la HSD17B5 se comportaba como un promotor débil en células de cáncer de mama MCF-7, decidimos analizar si su actividad en estas células era también inducible por cAMP. Con este fin diseñamos un experimento en el cual tratábamos células MCF-7 con forskolina, compuesto que provoca un aumento del cAMP al activar la adenilato ciclasa [36]. En el experimento se sembraron 125000 células por pocillo en placas de 24 pocillos, dejándose incubar durante 24 horas. Después, tras lavar con PBS, se cambió a medio sin esteroides y se cotransfectaron con 0,4 µg por pocillo de la construcción a analizar y 1 ng del vector de expresión de *Renilla reniformis* con *Lipofectamine* 2000, dejándolas incubar 24 horas.

Posteriormente, se lavó con PBS y cada construcción se trató con forskolina, usando como control del experimento la adición sólo de EtOH, usado como vehículo para la adición del compuesto dejándolas otras 24 horas en incubación. Pasado ese tiempo, se procedió a lisar las células y medir las actividades luciferasa, normalizándolas para luego relativizarlas para los resultados obtenidos para cada construcción en los experimentos control. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 11, observándose una inducción de la actividad promotora en respuesta al aumento del cAMP intracelular en todas las construcciones analizadas.



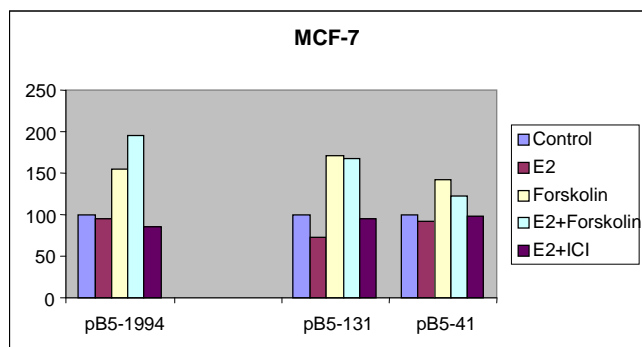


**Figura 11. Inducción por cAMP de la actividad promotora del gen HSD17B5 en células MCF-7.** Se muestran las actividades luciferasa normalizadas respecto a la actividad Renilla usada como control de transfección y respecto a la cantidad total de proteína, de diferentes construcciones basadas en el promotor de la HSD17B5 tras la adición de forskolina, sustancia que activa de manera general las vías de señalización celular en las que está implicada el cAMP. En todos los casos se relativizaron los resultados para cada construcción con respecto al control (EtOH, usado como vehículo).

#### 4.5. Evaluación de la acción del E2 en la actividad promotora del extremo 5' del gen HSD17B5 en la línea celular MCF-7.

Una vez confirmada la actividad transcripcional del extremo 5' del gen HSD17B5 en células MCF-7, y también la posibilidad de estimular esta actividad con forskolina, se pasó a evaluar si la represión por E2 de la expresión de la HSD17B5 en estas células se producía a través de su promotor proximal. Con este fin se diseñaron experimentos de transfección con diferentes construcciones que abarcaban zonas distintas de dicho promotor y las células transfectadas se trataron con E2 en presencia y ausencia de forskolina e ICI182780.

El desarrollo de los experimentos se llevó a cabo siguiendo los mismos pasos que los detallados en los apartados anteriores. La única diferencia fue que, pasadas las 24 horas de incubación tras la transfección de las células con las distintas construcciones, las células se trataron EtOH (células control), con forskolina, con E2 sólo, con una mezcla de ambos o con una mezcla de E2 e ICI182780. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 12.



**Figura 12.** La represión de la expresión del gen HSD17B5 en células MCF-7 por parte del E2, no se produce a través de su promotor proximal.

La figura muestra que el tratamiento con E2 no modifica la actividad transcripcional de las construcciones en células MCF-7, ni en ausencia (condiciones basales), ni en presencia de forskolina (promotor inducido).

## **DISCUSIÓN.**

Se sabe que la mayoría de los cánceres de mama son sensibles a hormona en sus etapas iniciales, con el E2 jugando un papel importante en la génesis y desarrollo del tumor. Sin embargo, resulta paradójico que un porcentaje importante de estos tumores se produzcan en la menopausia [37], en la que el nivel de estrógenos circulante está disminuido, lo que sugiere una síntesis local de estrógenos activos, con la necesaria participación de ciertas enzimas entre las que se encuentran algunas  $17\beta$ -HSDs.

Entre los mecanismos típicos de control que presentan las hormonas para determinar su biodisponibilidad se encuentra la regulación de los procesos que determinan su producción y metabolismo. Las  $17\beta$ -HSDs son un grupo de enzimas que participan en la biosíntesis de hormonas esteroideas, como es el caso del E2 y la T con las enzimas que tienen actividad reductora, en las gónadas y tejidos diana como mama y próstata con el consiguiente aumento del efecto fisiológico producido por dichas hormonas. Por el contrario hay  $17\beta$ -HSDs que tienen actividad oxidante, lo que contribuiría a una menor biodisponibilidad de E2 y T en los tejidos diana y el consiguiente efecto protector respecto al exceso de acción de la hormona. Estos hechos cobran especial relevancia en el caso, por ejemplo, del control y protección frente al desarrollo de tumores en mama y próstata, en los que es bien conocido el papel que juegan los esteroides sexuales.

Es bien sabido que una hormona puede participar en la regulación de su propio proceso de biosíntesis. En lo referido a las  $17\beta$ -HSDs, se ha descrito, por ejemplo, que la P está implicada en la regulación indirecta de la  $17\beta$ -HSD de tipo 2 en endometrio [38]. También, el E2 participa de la regulación de la expresión de la  $17\beta$ -HSD de tipo 8 [29, 30] en células de cáncer de mama MCF-7, así como la T en la de tipo 5 en líneas celulares de cáncer de próstata [35].

Trabajos previos de nuestro laboratorio [33] muestran, por otro lado, que el E2 reprime la expresión de la  $17\beta$ -HSD de tipo 5 (también conocida como AKR1C3) en la línea celular de cáncer de mama MCF-7. Esta enzima cataliza la reducción de androstenodiona a T, de E1 a E2 y, también, de P a 20-hidroxiprogesterona. Se ha demostrado que en células MCF-7 estas reacciones en su conjunto provocan un aumento de la señal proliferativa al incrementar la relación E2/P, lo que contribuye al desarrollo tumoral. Este hecho se ha corroborado al constatar que la expresión de dicha enzima se encuentra aumentada en tejido mamario tumoral con respecto al tejido normal

[39], además de estar asociado a un peor pronóstico [40]. Por todo ello, la elucidación del mecanismo de retroalimentación negativa en la expresión de la 17 $\beta$ -HSD de tipo 5 se ha convertido en una interesante diana en la investigación del tratamiento de tumores mamarios.

Es suficientemente conocido el hecho de que el estradiol ejerce sus efectos genómicos con la necesaria participación del receptor de estrógenos [41]. Por ello, decidimos analizar el promotor proximal de la HSD17B5 con el fin de comprobar si el estradiol y su receptor están implicados en su regulación. El análisis informático del extremo 5' del gen HSD17B5 había mostrado que contiene diversos elementos de respuesta a andrógenos que podrían explicar la regulación de su expresión en células de próstata por parte de una hormona en cuya síntesis está implicada. Sin embargo, aunque también se han detectado variaciones en la expresión de esta enzima en algunos cánceres de mama, como aumentos en el carcinoma ductal *in situ* [42] y disminuciones en otros casos [2], este análisis no ha mostrado la presencia de posibles elementos de respuesta a estrógenos en su promotor proximal. Por tanto, nos pareció necesario confirmar que la represión observada en células MCF-7, que expresan de manera constitutiva el ER $\alpha$ , no era reproducible en células que no expresaran dicho receptor (como es el caso de la línea celular HepG2) a no ser que se este se introdujera de manera ectópica. Los resultados mostrados en la figura 9 corroboran la necesaria participación del ER en la acción represora del E2 sobre la expresión del gen de la HSD17B5.

Aunque el análisis informático del extremo 5' del gen *HSD17B5* no había detectado posibles ERE si que había mostrado posibles motivos de unión a otros factores de transcripción (C/EBP $\alpha$ , SP1) que pueden mediar la acción de los estrógenos por mecanismos de *crosstalk* con el ER [29, 43]. Por tanto en este trabajo, se analizó la actividad transcriptor del promotor del gen HSD17B5 con diferentes construcciones quiméricas que abarcan hasta 2 kb de secuencia. Nuestros resultados muestran que tanto en células MCF-7 como HepG2 (figura 10), el extremo 5' del gen HSD17B5 se comporta como un promotor débil. También muestran que este promotor débil podía aumentar su actividad transcripcional si era activado de manera general (figura 11), como sucede con la adición de forskolina que aumenta la concentración intracelular de cAMP al activar la adenilato ciclase. Este 2º mensajero es capaz de activar proteinquinas que tengan como sustrato factores de transcripción activándolos, como es el

caso del ER, hecho que también debe ser tenido en cuenta para una correcta interpretación de los resultados.

Cuando se realizaron los experimentos clave de este trabajo, en los que se analizaba la actividad transcripcional del promotor de la HSD17B5 en presencia de E2, se obtuvieron resultados que matizaban la hipótesis original del trabajo, ya que la región promotora analizada no se veía afectada por la acción del estradiol, como se puede comprobar en los datos que se muestran en la figura 12. No se producían diferencias estadísticamente significativas en el nivel de expresión génica gobernado por el promotor de la HSD17B5 al ser tratadas las células con el E2 a las concentraciones fisiológicas (figura 8). Además, la única variación significativa que se producía era la activación, no la represión, y sólo cuando se daban condiciones generales de activación como era el tratamiento con forskolina, independientemente de que hubiera E2 en el medio o no. Por tanto, nuestros resultados indican que el promotor proximal de la HSD17B5 no se ve afectado por la acción de una hormona (E2) en cuyo proceso de biosíntesis participa. Ahora bien, es preciso recordar que la región promotora completa de un gen puede abarcar una gran extensión de pares de bases, mucho mayor que las 2 Kb aquí analizadas, por lo que será necesario investigar otras regiones del gen, circunstancia que excede a las dimensiones de este trabajo.

## **CONCLUSIONES.**

A la vista de los resultados obtenidos en este trabajo podemos *concluir* que:

1. El tratamiento con  $17\beta$ -estradiol a concentraciones fisiológicas reprime la expresión de la HSD17B5 en la línea celular de cáncer de mama sensible a estrógenos MCF-7.
2. La represión por E2 de la expresión de la  $17\beta$ -HSD de tipo 5 en células MCF-7 es mediada por el ER $\alpha$  por lo que puede revertirse con antagonistas del mismo como el ICI182780.
3. En células MCF-7 el extremo 5' del gen *HSD17B5* se comporta como un promotor débil inducible por cAMP. La región del promotor comprendida entre los nucleótidos -131/-41 contiene los elementos promotores mínimos del gen y es suficiente para alcanzar valores de actividad máximos en estas células.
4. El promotor proximal de la HSD17B5 no es el responsable de la represión de la expresión del gen en células de carcinoma de mama MCF-7 tras el tratamiento con E2, ni en condiciones basales ni de activación general.



## **BIBLIOGRAFÍA.**

1. Lin, H.K., et al., *Characterization of a monoclonal antibody for human aldo-keto reductase AKR1C3 (type 2 3alpha-hydroxysteroid dehydrogenase/type 5 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase); immunohistochemical detection in breast and prostate*. Steroids, 2004. **69**(13-14): p. 795-801.
2. Haynes, B.P., et al., *Intratumoral estrogen disposition in breast cancer*. Clin Cancer Res, 2010. **16**(6): p. 1790-801.
3. Rotinen, M., J. Villar, and I. Encio, *Regulation of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenases in cancer: regulating steroid receptor at pre-receptor stage*. J Physiol Biochem, 2012.
4. Miller, W.L., *Molecular biology of steroid hormone synthesis*. Endocr Rev, 1988. **9**(3): p. 295-318.
5. Hewitt, S.C., J.C. Harrell, and K.S. Korach, *Lessons in estrogen biology from knockout and transgenic animals*. Annu Rev Physiol, 2005. **67**: p. 285-308.
6. Guyton, A.C., in *Textbook of Medical Physiology*. 2006, Elsevier Saunders. p. 1016-1018.
7. Saloniemä, T., *Role of human hydroxysteroid (17b) dehydrogenase type 1 (HSD17B1) in steroid-dependent disease in females – Novel indications for HSD17B1*. 2009, Universitatis Turkuensis.
8. Sanderson, J.T., *The steroid hormone biosynthesis pathway as a target for endocrine-disrupting chemicals*. Toxicol Sci, 2006. **94**(1): p. 3-21.
9. Zhu, B.T. and A.H. Conney, *Functional role of estrogen metabolism in target cells: review and perspectives*. Carcinogenesis, 1998. **19**(1): p. 1-27.
10. Yang, N.N., et al., *Identification of an estrogen response element activated by metabolites of 17beta-estradiol and raloxifene*. Science, 1996. **273**(5279): p. 1222-5.
11. Maggi, A., Ciana, P., Belcredito S., *Estrogens in the nervous system: Mechanisms and nonreproductive functions*. Annu. Rev. Physiol., 2004. **66**: p. 291-313.
12. Peñuelas, I., Encio, I., *Estructura, función y mecanismo de acción del receptor de glucocorticoides humano*. Endocrinología, 1995. **42**: p. 91-98.
13. Peng, J.e.a., in *Principles of Molecular Oncology.*, H. Press, Editor. 2009. p. 189-200.
14. Bjornstrom, L. and M. Sjöberg, *Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes*. Mol Endocrinol, 2005. **19**(4): p. 833-42.
15. Biswas DK, S.S., Shi Q, PARdee AB, Iglehart JD, *Crossroads of estrogen receptor and NF-kappaB signalling*. Sci STKE, 2005. **288**(pe27).
16. Hall JM, C.J., Korach KS, *The multifaceted mechanisms of estradiol and estrogen receptor signalling*. J Biol Chem, 2001. **276**: p. 36869-36872.
17. Ahmad, N., Kumar, R. (2010) *Steroid hormone receptors in cancer development: A target for cancer therapeutics*. **Volume**, DOI: Cancer Letters. Doi:10.1016
18. Luu-The, V., *Analysis and characteristics of multiple types of human 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2001. **76**(1-5): p. 143-51.
19. Adamski, J. and F.J. Jakob, *A guide to 17beta-hydroxysteroid dehydrogenases*. Mol Cell Endocrinol, 2001. **171**(1-2): p. 1-4.
20. Moeller, G. and J. Adamski, *Integrated view on 17beta-hydroxysteroid dehydrogenases*. Mol Cell Endocrinol, 2009. **301**(1-2): p. 7-19.
21. Andersson, S., et al., *The molecular biology of androgenic 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenases*. J Steroid Biochem Mol Biol, 1995. **53**(1-6): p. 37-9.

22. Luu-The, V. and F. Labrie, *The intracrine sex steroid biosynthesis pathways*. Prog Brain Res, 2010. **181**: p. 177-92.
23. Qin, K. and R.L. Rosenfield, *Characterization of the basal promoter element of the human type 5 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase gene*. Biochim Biophys Acta, 2005. **1728**(3): p. 115-25.
24. Du, X., R.L. Rosenfield, and K. Qin, *KLF15 Is a transcriptional regulator of the human 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 5 gene. A potential link between regulation of testosterone production and fat stores in women*. J Clin Endocrinol Metab, 2009. **94**(7): p. 2594-601.
25. Vihko, P., et al., *Control of cell proliferation by steroids: the role of 17HSDs*. Mol Cell Endocrinol, 2006. **248**(1-2): p. 141-8.
26. Penning, T.M. and M.C. Byrns, *Steroid hormone transforming aldo-keto reductases and cancer*. Ann N Y Acad Sci, 2009. **1155**: p. 33-42.
27. Aka, J.A., M. Mazumdar, and S.X. Lin, *Reductive 17beta-hydroxysteroid dehydrogenases in the sulfatase pathway: critical in the cell proliferation of breast cancer*. Mol Cell Endocrinol, 2009. **301**(1-2): p. 183-90.
28. Purohit, A., et al., *The regulation and inhibition of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase in breast cancer*. Mol Cell Endocrinol, 2006. **248**(1-2): p. 199-203.
29. Rotinen, M., et al., *Estradiol induces type 8 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase expression: crosstalk between estrogen receptor alpha and C/EBPbeta*. J Endocrinol, 2009. **200**(1): p. 85-92.
30. Villar, J., et al., *Transcriptional regulation of the human type 8 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase gene by C/EBPbeta*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2007. **105**(1-5): p. 131-9.
31. Rotinen, M., et al., *Transcriptional regulation of type 11 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase expression in prostate cancer cells*. Mol Cell Endocrinol, 2011. **339**(1-2): p. 45-53.
32. Rotinen, M., et al., *Type 10 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase expression is regulated by C/EBPbeta in HepG2 cells*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2010. **122**(4): p. 164-71.
33. Rotinen, M., *Mecanismos de regulación de la transcripción de las 17β-deshidrogenasas de esteroides humanas.*, in *Health Sciences*. 2011, Universidad Pública de Navarra: Pamplona.
34. Dauvois, S., R. White, and M.G. Parker, *The antiestrogen ICI 182780 disrupts estrogen receptor nucleocytoplasmic shuttling*. J Cell Sci, 1993. **106 ( Pt 4)**: p. 1377-88.
35. Fung, K.M., et al., *Increased expression of type 2 3alpha-hydroxysteroid dehydrogenase/type 5 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase (AKR1C3) and its relationship with androgen receptor in prostate carcinoma*. Endocr Relat Cancer, 2006. **13**(1): p. 169-80.
36. Bermont L, L.-M.F., Chezy E, Weisz A, Adessi GL, *17beta-estradiol inhibits forskolin-induced vascular endothelial growth factor promoter in MCF-7 breast adenocarcinoma cells*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2001. **78**(4): p. 343-9.
37. Chetrite, G.S. and J.R. Pasqualini, *The selective estrogen enzyme modulator (SEEM) in breast cancer*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2001. **76**(1-5): p. 95-104.
38. Cheng, Y.H., et al., *SP1 and SP3 mediate progesterone-dependent induction of the 17beta hydroxysteroid dehydrogenase type 2 gene in human endometrium*. Biol Reprod, 2006. **75**(4): p. 605-14.
39. Shibuya, R., et al., *Intratumoral concentration of sex steroids and expression of sex steroid-producing enzymes in ductal carcinoma in situ of human breast*. Endocr Relat Cancer, 2008. **15**(1): p. 113-24.
40. Oduwole, O.O., et al., *17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 is an independent prognostic marker in breast cancer*. Cancer Res, 2004. **64**(20): p. 7604-9.

41. Edwards, D.P., *Regulation of signal transduction pathways by estrogen and progesterone*. *Annu Rev Physiol*, 2005. **67**: p. 335-76.
42. Byrns, M.C. and T.M. Penning, *Type 5 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase/prostaglandin F synthase (AKR1C3): role in breast cancer and inhibition by non-steroidal anti-inflammatory drug analogs*. *Chem Biol Interact*, 2009. **178**(1-3): p. 221-7.
43. Xie, W., et al., *Transcriptional activation of thymidylate synthase by 17beta-estradiol in MCF-7 human breast cancer cells*. *Endocrinology*, 2000. **141**(7): p. 2439-49.