



**Universitat de les
Illes Balears**

Facultat de Ciències

Memoria del Trabajo de Fin de Grado

Acción de la genisteína en el tratamiento del cáncer de mama con citotóxicos en función de la dotación de receptores estrogénicos

Daniel Palou Gramón

Grado de Bioquímica

Año académico 2013-14

DNI del alumno: 78219147B

Trabajo tutelado por María Pilar Roca Salom
Departament de Biologia Fonamental i Ciències de la Salut

Se autoriza a la Universidad a incluir mi trabajo en el Repositorio Institucional para su consulta en acceso abierto y difusión en línea, con finalidades exclusivamente académicas y de investigación.

Palabras clave del trabajo:

Cáncer de mama, genisteína, citotóxicos, receptores de estrógenos, proliferación celular, apoptosis, ROS.

ÍNDICE

RESUMEN	4
1.- INTRODUCCIÓN	5
1.1.- Epidemiología y etiología.....	5
1.2.- Estrógenos y receptores de estrógenos	6
1.2.1.- Estructura de los receptores de estrógenos	7
1.2.2.- Mecanismo de activación de los receptores de estrógenos	8
1.2.3.- Participación de los receptores de estrógenos en la inducción del cáncer de mama.....	10
1.3.- Tratamientos	11
1.3.1.- Cisplatino	11
1.3.2.- Paclitaxel.....	11
1.3.3.- Tamoxifeno.....	12
1.4.- Genisteina.....	12
1.5.- Objetivos.....	13
2.- MATERIALES Y MÉTODOS	15
2.1.- Cultivos celulares y tratamientos.....	15
2.2.- Viabilidad celular	15
2.3.- Análisis del contenido lisosomal	16
2.4.- Análisis del potencial de membrana mitocondrial.....	16
2.5.- Análisis de la producción de ROS.....	16
2.6.- Análisis estadístico.....	17
3.- RESULTADOS	18
3.1.- Efectos de la GEN y los citotóxicos sobre la proliferación celular	18
3.2.- Efectos de la GEN y los citotóxicos sobre la apoptosis celular.....	19
3.3.- Efectos de la GEN y los citotóxicos sobre el potencial de membrana mitocondrial	20
3.4.- Efectos de la GEN y los citotóxicos sobre la producción de ROS	21
4.- DISCUSIÓN	23
5.- CONCLUSIONES	26
6.- BIBLIOGRAFIA	27

RESUMEN

El cáncer de mama es el cáncer de mayor incidencia en las mujeres, a pesar de ello las investigaciones llevadas a cabo en los últimos años han conseguido que la tasa de mortalidad se vaya reduciendo. Hoy día se sabe que uno de los factores etiológicos más importantes son los niveles de estrógenos y la dotación de receptores estrogénicos, receptor de estrógenos beta ($ER\beta$) y receptor de estrógenos alfa ($ER\alpha$), de la mujer.

Por eso en este trabajo se intentó determinar la participación de la genisteína, un fitoestrógeno que proviene de la soja y que tiene la capacidad de unirse a los ER, en el tratamiento con citotóxicos del cáncer de mama en función de la predominancia de $ER\alpha$ o $ER\beta$. Para ello se dispuso de dos líneas celulares con diferente ratio $ER\alpha/ER\beta$, MCF7 (ratio $ER\alpha/ER\beta$ alto) y T47D (ratio $ER\alpha/ER\beta$ bajo), y se las sometió a tratamientos con cisplatino (CDDP), paclitaxel (PTX), tamoxifeno (TAM), genisteína (GEN) y la combinación de cada uno de los citotóxicos con la GEN. Así posteriormente se determinaron algunos parámetros como la viabilidad celular, apoptosis celular, potencial de membrana mitocondrial y la producción de ROS.

De esta manera se observó que el tratamiento con GEN parece ser que en ningún caso es beneficioso para combatir las células cancerosas en las mujeres con una dotación de ER predominantemente alfa y puede ser efectivo en el tratamiento con TAM del cáncer de mama con un ratio $ER\alpha/ER\beta$ bajo. Sin embargo, es necesaria más investigación para determinar la implicación de la GEN en el control del crecimiento celular mediante $ER\beta$, así como estudiar los mecanismos de acción intrínsecos a su función.

1.- INTRODUCCIÓN

1.1.- Epidemiología y etiología

El cáncer hoy día representa una de las principales causas de muerte en España, precedido sólo por las enfermedades cardiovasculares. Por ello, la investigación contra el cáncer se ha convertido ahora en la principal preocupación de la sociedad, una vez se han erradicado casi por completo otras enfermedades que han causado miles de muertes y que fueron en su día la principal causa de muerte en nuestro país.

La incidencia del cáncer en España alcanza cifras realmente elevadas siendo de 714.4/100000 habitantes y de 736.2/100000 hab. en Europa. Mientras que la mortalidad alcanza los 307.3/100000 hab. en España y los 351.3/100000 hab. en el conjunto europeo, lo que supone que cerca de un 45% de las personas diagnosticadas de cáncer acaban muriendo o lo que es lo mismo, unas 150000 personas mueren cada año a causa del cáncer en España.¹

En el caso de la mujer, el cáncer de mama es el que presenta mayor incidencia tanto a nivel español como europeo, con más del 30% del total de casos de cáncer en el sexo femenino. A pesar de eso, los esfuerzos de los últimos años por combatir este tipo de tumores no han sido en vano, siendo ahora el cáncer de mama uno de los que muestra una tasa de mortalidad menor, con cerca de un 17% de fallecimientos del total de casos diagnosticados.¹

Sin embargo aún no se ha conseguido un tratamiento quimioterapéutico eficaz, y el descenso en la mortalidad es debido principalmente a la mejora de las técnicas de detección, lo que permite aplicar procesos quirúrgicos localizados que posibilitan la extracción segura del tumor mamario, si bien el tratamiento con quimioterapéuticos permite controlar el tamaño de la tumoración, a día de hoy no es capaz de eliminar por completo las células cancerosas en la mayoría de procesos tumorales. Este hecho puede ser debido a que la etiología del cáncer es variada y en especial la del cáncer de mama, dónde participan una gran variedad de factores exógenos y endógenos. Así mismo también se ha conseguido disminuir la incidencia del cáncer de mama gracias a la limitación de la terapia hormonal de reemplazo, que se ha demostrado fuerte inductor de los procesos tumorales mamarios.²

En los últimos años se han ido identificando diversos factores de riesgo que participan en el desarrollo del cáncer de mama, si bien es verdad que los mecanismos con los que actúan aún no están bien definidos en algunos casos. Algunos de ellos se indican a continuación.

Una edad de menarquia temprana, junto con una menopausia tardía incrementa el riesgo, debido a la exposición prolongada a niveles elevados de estrógenos y progesterona, puesto que por lo general estas hormonas participan en las vías de inducción de la proliferación del tejido mamario. Igualmente el uso de la terapia hormonal de reemplazo y la dotación de receptores estrogénicos aumentan la propensión a desarrollar el tumor.^{3,4}

La obesidad en la postmenopausia es un importante factor de riesgo en el desarrollo canceroso, ya que se ha observado que las mujeres con obesidad (IMC>30) presentan un 31% más de propensión a padecer cáncer de mama que las mujeres con normopeso (IMC<25)⁵. Este hecho puede explicarse por la capacidad del tejido adiposo para sintetizar estrógenos, con lo que se prolonga la exposición a estas hormonas, propiciando así la aparición de células cancerosas.^{4,5}

El embarazo parece ejercer efectos negativos y positivos, ya que durante y justo después del embarazo se incrementa el riesgo, debido probablemente al aumento de los niveles de estrógenos para hacer frente al desarrollo de la glándula mamaria. En cambio el hecho de haber tenido como mínimo un embarazo parece disminuir esta propensión en cerca de un 25%, llegando hasta un 39% en el caso de mujeres que han tenido más de siete hijos^{3,4}, este hecho se ha relacionado epidemiológicamente con un fenotipo ER-positivo.⁴

Los antecedentes familiares y la predisposición genética, tal como mutaciones en oncogenes o supresores tumorales, por ejemplo BRCA1, BRCA2 o p53, pueden ser la causa de la progresión tumoral, si bien estos incrementan cerca de un 25% el riesgo, sólo alrededor de un 10% de los cánceres de mama tienen una causa primaria genética o hereditaria.⁶

1.2.- Estrógenos y receptores de estrógenos

Los estrógenos son hormonas esteroideas sintetizadas y secretadas principalmente por el tejido ovárico con acción en diversos tejidos como endometrio, ovarios, huesos y mama, principalmente.⁷

Uno de los estrógenos sintetizados en mayor medida y que por lo tanto juegan un papel más importante en la fisiología humana es el 17 β -estradiol (E2). E2 participa de manera notable en el desarrollo de la glándula mamaria en la pubertad, durante el embarazo y la lactancia y parece ser que además controla la proliferación celular en las situaciones tanto fisiológicas como patológicas.⁸

Pero no solo los estrógenos son realmente importantes en el control de las funciones y desarrollo de las estructuras humanas, sino que sus receptores, los receptores de estrógenos (ER), serían los encargados de regular la respuesta de cada tejido a los estrógenos.⁷

Hasta 1995 se creía que únicamente existía un tipo de ER, el llamado ER α , sin embargo ese año se descubrió un segundo ER, el ER β . Ambos receptores se expresan en diferente proporción en los tejidos y parece ser que tendrían funciones diferentes, aun así, a día de hoy no se conocen claramente las funciones que desarrolla cada uno de los tipos de ER.^{7,8}

Así mismo, estudios en ratas *knock out* para ER muestran que ninguno de los dos tipos de ER son necesarios en la diferenciación temprana del sistema reproductivo, si bien posteriormente ambos ER son necesarios para el buen funcionamiento de los ovarios, ER α lo es para la correcta formación uterina y para el desarrollo mamario, en definitiva parece ser que ER α participaría en funciones que conducen a la proliferación celular mientras que ER β lo haría en funciones antiproliferativas.⁷⁻⁹

Sin embargo, las funciones de ER β no están tan claras y numerosos estudios se han aventurado a apuntar algunos posibles roles, respaldando una posible doble faceta en la que ER β podría actuar de manera distinta dependiendo del entorno y la situación.^{8,9}

1.2.1.- Estructura de los receptores de estrógenos

Ambos receptores, ER α y ER β , son miembros de la superfamilia de receptores nucleares, por lo que median la acción genómica de los estrógenos actuando como factores de transcripción dependientes de ligando.¹⁰

Por lo general los ER tienen cinco dominios funcionales, tres de los cuales desarrollan una función importante en la actividad de los ER; el dominio N-terminal (A/B) contiene el factor activador (AF-1) que participa como centro de interacción con la maquinaria de transcripción, presenta un 18% de homología entre ER α y ER β . El dominio de unión a ADN (C) muy conservado

(97% de homología) contiene dos regiones estructurales de zinc que permiten la unión al elemento de respuesta a estrógenos (ERE) además de modular la dimerización con el dominio de unión a ligando (E) (59% de homología). También presenta una región bisagra (D) y finalmente un dominio C-terminal (F) que media la unión a ligando, la dimerización y la translocación nuclear del receptor (*figura 1*).^{10,11}

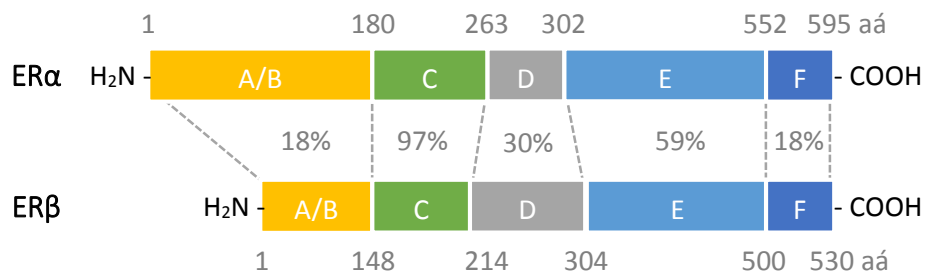


Figura 1: Representación de la estructura proteica de los dos receptores estrogénicos. El número de aminoácidos de cada dominio se indica en la parte superior de cada estructura, además se muestra la homología en porcentaje entre los dominios de cada receptor, ERα y ERβ.

1.2.2.- Mecanismo de activación de los receptores de estrógenos

Se conocen diversas vías por las que los ER se activan y llevan a cabo sus funciones biológicas. Después de la unión del ligando al receptor, ya sea en el citoplasma y posterior translocación al núcleo o directamente en el núcleo celular, ERα y ERβ se disocian de las proteínas de choque térmico (HSP) y pueden formar homodímeros o heterodímeros y unirse directamente a los ERE mediante el dominio de unión a ADN (*figura 2*).^{7,11}

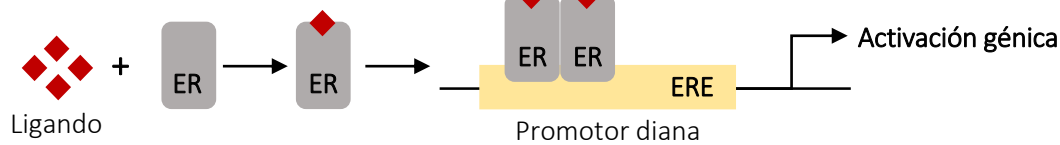
Otro mecanismo de activación o, en este caso, también de inhibición, consiste en la unión del dímero de ER a una secuencia no ERE a través de otros factores de transcripción como los complejos Fos/Jun, también llamados elementos de respuesta a AP-1 o SP-1.¹¹

Así mismo, los ER pueden llevar a cabo acciones no genómicas con las que regulan cascadas de señalización a través de interacciones proteína-proteína o con segundos mensajeros (SM) después de la unión del ligando a ER. Este mecanismo permite ejercer rápidamente toda una serie de efectos fisiológicos.¹¹

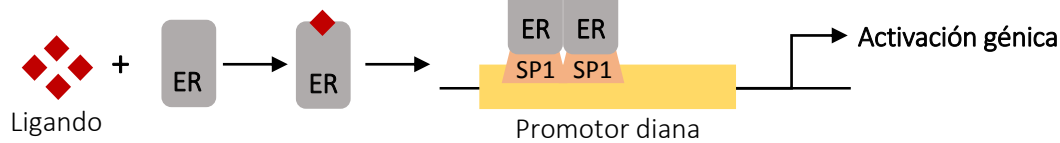
Finalmente estos receptores también pueden inducir sus efectos sin la necesidad de unión del ligando, eso se consigue a través de la fosforilación de los ER por una serie de proteínas

quinasas activadas en respuesta a factores de crecimiento, eso puede explicar el crecimiento de algunos tumores independientemente de los niveles hormonales.^{7,11}

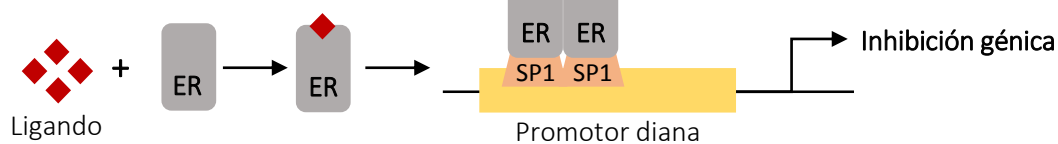
Activación directa



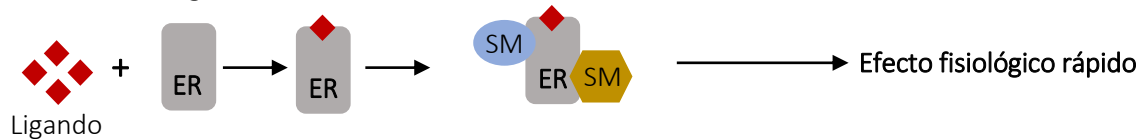
Activación indirecta



Inhibición indirecta



Activación no genómica



Activación independiente de ligando

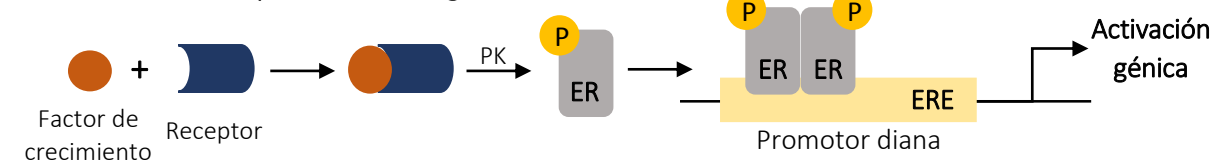


Figura 2: Modelo representativo de los distintos mecanismos de activación de los receptores estrogénicos.

En la regulación transcripcional de los ER también participan los coreguladores o cofactores, estos son de naturaleza proteica y activan o inactivan (coactivadores o corepresores) la actividad transcripcional de los ER. Por lo general los cofactores son enzimas como acetilasas o desacetilasas, quinasas o fosfatasas y metilasas o desmetilasas que modifican los factores proteicos situados en el lugar de unión de los ER o su vecindad¹¹.

Se ha observado que la distribución de cofactores no es homogénea en los tejidos, lo que podría explicar, al menos en parte, los diferentes efectos de los estrógenos o los moduladores selectivos de los receptores estrogénicos (MSRE), como el tamoxifeno, en tejidos

distintos. A este hecho hay que añadir que la dotación de ER α y ER β tampoco es homogénea.^{10,11}

1.2.3.- Participación de los receptores de estrógenos en la inducción del cáncer de mama

Desde hace años se sabe que ER α juega un papel central en el desarrollo y proliferación del cáncer de mama, sin embargo la participación de ER β aún no está del todo clara.

Como ya se ha comentado anteriormente, los estrógenos participan activamente en la inducción y progresión tumoral, ya que su unión preferencial a ER α induce la expresión de genes que participan en la proliferación celular como pueden ser la ciclina D1 o c-myc. En cambio la unión a ER β , se ha postulado que induce la expresión de genes antiproliferativos y proapoptóticos. Sin embargo ER β en ausencia de ligando puede regular también la expresión de algunos genes regulados por ER α con E2.⁸

Además algunos estudios muestran que ER β también participa como regulador negativo de la actividad de ER α , y es que ER β podría inhibir la actividad transcripcional de ER α y además disminuir la sensibilidad de la célula a E2. Así mismo se ha observado que en células MCF-7, ER β aumenta la degradación de ER α inducida por E2 y disminuye los niveles de ARNm de ER α .^{8,12}

Sin embargo otros estudios proponen que ER β actúa de manera diferente en función de si se coexpresa con ER α o se expresa solo. Así la coexpresión de ER β junto con ER α se correlaciona con un mejor pronóstico para la mujer, ya que aquí ER β induce la expresión de genes antiproliferativos y proapoptóticos. En cambio, la expresión de ER β en tumores ER α -negativos se puede correlacionar con un peor pronóstico, pues induce el crecimiento y la supervivencia de las células tumorales. Igualmente se relacionan los tumores ER α -positivos y ER β -negativos.⁹

De la misma manera se hipotetiza que la doble faceta de ER β puede venir determinada, al menos en parte, por la diferente regulación a la que es sometido en función de los cofactores que se expresan en un determinado momento.⁹

Así mismo se ha observado que los niveles de ER β disminuyen a lo largo del proceso tumoral mientras que los niveles de ER α permanecen invariables, este hecho ha llevado a algunos investigadores a clasificar al ER β como supresor tumoral.⁹

1.3.- Tratamientos

Algunos de los tratamientos usados para luchar contra el cáncer de mama son el cisplatino (CDDP), paclitaxel (PTX), y el tamoxifeno (TAM). Los mecanismos de acción de cada uno de estos citotóxicos son variados, y en general pueden presentar diversas formas de actuación.

1.3.1.- Cisplatino

El CDDP es un agente alquilante que se une al ADN nuclear (ADNn) ocasionando toda una serie de desórdenes en él. Puede causar la fragmentación del ADN, ya que la maquinaria de reparación intenta, inútilmente, eliminar las bases alquiladas. Además se inhibe la replicación y transcripción ya sea por impedir directamente el acoplamiento de la maquinaria de replicación o transcripción al ADN o por la formación de enlaces entrecruzados entre ambas cadenas de ADN que impiden su separación y unión de la maquinaria. Así mismo también puede provocar emparejamientos erróneos de nucleótidos que pueden conducir a la aparición de mutaciones que llevan a la célula a activar sus mecanismos proapoptóticos.¹³

Sin embargo, la capacidad del CDDP para inducir el daño sobre el ADNn no es suficiente para explicar su alto grado de eficacia. Por ello, parece ser que también induce la generación de ROS, aunque los mecanismos con los que lleva a cabo este efecto aún no están del todo claros, se propone que el CDDP también afecta al ADN mitocondrial (ADNmt), con lo que la síntesis de las proteínas de la cadena de transporte de electrones se vería comprometida, acarreando consigo la disfunción de la mitocondria y el aumento en la generación de ROS.¹⁴

1.3.2.- Paclitaxel

El PTX altera el funcionamiento y estructura normal del citoesqueleto, llevando a la estabilización aumentada de los microtúbulos, lo cual interfiere en todos los procesos celulares en los que participa. Concretamente el PTX se une a la subunidad β de la tubulina, proteína que forma los microtúbulos, con lo que se establecen uniones fuertes entre las subunidades α y β de la tubulina, perdiendo así su capacidad para desacoplarse y hacer del citoesqueleto una estructura dinámica y funcional. Esta inhibición de la despolimerización de los microtúbulos paraliza el ciclo celular en la fase M, induciéndose finalmente la apoptosis de la célula.¹⁵

Otro de los mecanismos de acción del PTX más importantes es el aumento en los niveles de radicales libres. El PTX promueve la generación de ROS mediante el aumento de la actividad

de la NADPH oxidasa (NOX) asociada a la membrana plasmática, a través del aumento de la translocación de la proteína reguladora positiva de NOX, la Rac1, a la membrana plasmática celular. Así se incrementa la expresión de NOX y con ello la oxidación de NADPH a NADP⁺ y peróxido de hidrógeno, con lo que se induce un estrés oxidativo que termina con la muerte celular causada por daño oxidativo sobre proteínas, lípidos y ácidos nucleicos.¹⁶

1.3.3.- Tamoxifeno

El TAM es un agente no esteroideo que se une específicamente a los ER induciéndoles un cambio conformacional que resulta en la inhibición y/o el cambio en la expresión de los genes regulados por estrógenos a través de ER. El TAM puede actuar como antagonista y también como agonista en función del tipo de ER, así participa como antagonista sobre ER α y como agonista sobre ER β , activando genes proapoptóticos o inhibiendo genes que participan en la proliferación celular.^{17,18}

El TAM también aumenta la producción de ROS a través del incremento en la concentración de Ca²⁺ intramitocondrial y la estimulación de la óxido nítrico sintasa mitocondrial (mtNOS). Con la estimulación de la mtNOS se incrementa la producción de NO que a la vez dificulta la respiración mitocondrial, se libera el citocromo c al citoplasma, se eleva la tasa de peroxidación lipídica mitocondrial y se aumenta la oxidación de ciertas proteínas mitocondriales a través del peroxinitrito producto de la reacción del NO con el anión superóxido, finalmente se induce un estrés oxidativo en la célula que conduce a la activación de los mecanismos apoptóticos.^{18,19}

1.4.- Genisteina

La genisteina (GEN) (4'-5,7-trihidroxiisoflavona) es una de las isoflavonas que se encuentran en mayor concentración en los productos derivados de la soja (*figura 3A*)²⁰.

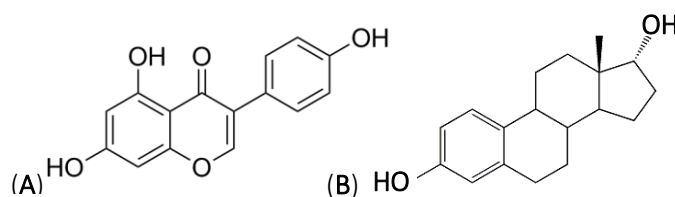


Figura 3: Estructura molecular de la genisteina (A) y del 17 β -estradiol (B).

Desde hace años se ha venido especulando sobre sus efectos beneficiosos y protectores contra el cáncer, sin embargo, no todos los resultados obtenidos hasta ahora apoyan esa hipótesis. A pesar de ello algunas revisiones actuales sobre el tema apoyan la postura de que el consumo de soja protege frente al cáncer de mama siempre y cuando sea consumida diariamente y durante toda la vida. Así se demuestra en estudios con mujeres asiáticas, americanas y asiáticas que viven en América, dónde sólo se observa un efecto protector en las mujeres asiáticas y las mujeres asiáticas que viven en América que no han cambiado los hábitos alimenticios.²¹

Sus efectos sobre el cáncer de mama son debidos a que la GEN tiene una estructura química muy parecida a la del E2 (*figura 3*), por lo que tiene la capacidad de unirse a los ER, tanto ER α como ER β , por ello la GEN se considera un potente fitoestrógeno.^{20,22}

Así mismo se ha observado que la GEN tiene mayor afinidad de unión hacia ER β que hacia ER α . No obstante, concentraciones bajas de GEN favorecen su unión a ER β , impidiendo la unión de E2 a ese receptor, pero permitiéndole la unión a ER α , por lo que se aumenta la proliferación celular. En cambio, dosis fisiológicas como las que se pueden encontrar en la sangre de mujeres asiáticas (1 μ M), permiten la unión de GEN tanto a ER β como a ER α , impidiendo así la acción de E2, en este caso se observa una disminución de la proliferación celular.²¹⁻²³

Además líneas celulares con ratio ER α /ER β bajo muestran una disminución de los niveles de ROS una vez han sido tratadas con GEN. Este efecto es debido en parte, a que la GEN mejora las defensas antioxidantes celulares, principalmente MnSOD y CuZnSOD, a través de la activación de las vías de señalización dependientes del factor nuclear κ B (NF κ B) y ERK 1/2.²⁴ Igualmente también se activan los mecanismos de biosíntesis y mejora de la función mitocondrial. Sin embargo líneas celulares con ratio ER α /ER β alto no muestran cambios en los niveles de ROS después del tratamiento con GEN.²⁵

Estos datos muestran el papel central que juega el ER β en el control de los genes relacionados con la regulación del estrés oxidativo y la proliferación celular.

1.5.- Objetivos

En este trabajo se determinó el efecto del tratamiento coadyuvante con genisteína sobre la respuesta al tratamiento con cisplatino, paclitaxel y tamoxifeno en líneas celulares de cáncer

de mama con diferente dotación de receptores estrogénicos. Se usó la línea MCF-7, con un ratio ER α /ER β alto, y la línea T47D, con un ratio ER α /ER β bajo.

Las líneas fueron tratadas con concentraciones fisiológicas de genisteína y con concentraciones que inducen la apoptosis de cada uno de los compuestos citotóxicos mencionados. Posteriormente se determinó la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), la viabilidad celular, la función mitocondrial y la apoptosis.

2.- MATERIALES Y MÉTODOS

2.1.- Cultivos celulares y tratamientos

Las líneas celulares de cáncer de mama que se usaron son la MCF7 con un ratio ER α /ER β elevado y la línea T47D con un ratio ER α /ER β bajo, ambas adquiridas a ATCC. Las células fueron mantenidas en el medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con un 10% de suero fetal bovino (FBS) y un 1% de antibióticos (penicilina y estreptomina), las condiciones de cultivo fueron de atmósfera del 5% de CO₂ y 37°C.

Ambas líneas celulares fueron tratadas por igual con GEN, CDDP, PTX, TAM y la combinación de GEN con cada uno de los tres citotóxicos mencionados. Para ello se dispusieron 15000 células de la línea MCF7 por pocillo en placa p96 y 18000 células por pocillo en el caso de la línea celular T47D.

A continuación se aplicaron los siguientes tratamientos:

Tratamiento		DMEM	GEN 1 μ M	CDDP 10 μ M	PTX 10 nM	TAM 10 μ M
CONTROL	Crecimiento	100 μ L				
	GEN	90 μ L	10 μ L			
	CDDP	90 μ L		10 μ L		
	PTX	90 μ L			10 μ L	
	TAM	90 μ L				10 μ L
COMBINACIÓN	GEN+CDDP	80 μ L	10 μ L	10 μ L		
	GEN+PTX	80 μ L	10 μ L		10 μ L	
	GEN+TAM	80 μ L	10 μ L			10 μ L

Las células tratadas fueron incubadas durante 48h en atmósfera del 5% CO₂ y 37°C.

2.2.- Viabilidad celular

El conteo de la cantidad aproximada de células por pocillo se realizó por medio de la tinción con cristal violeta. Se añadieron a cada pocillo 20 μ L de disolución de cristal violeta (cristal violeta 0.5% en ácido acético 30%), se reposó durante 10 minutos y se eliminó el colorante en un baño de agua destilada y finalmente se resuspendieron las células teñidas con

100 μL de metanol, se agitó la placa y se midió la absorbancia a 570 nm en el espectrofotómetro lector de microplacas (Power Wave XS, Bio-Tek®).

2.3.- Análisis del contenido lisosomal

El contenido en lisosomas de las células se determinó usando el fluoróforo monodancil cadaverina (MDC) a una concentración de 50 μM en pocillo, se leyó la fluorescencia a los 15 minutos mediante el fluorímetro lector de microplacas FLx800 (BIO-TEK® Winooski, Vermont, USA) a una longitud de onda de excitación de 340 nm y 535 nm de emisión.

Las medidas de fluorescencia fueron corregidas con el número de células por pocillo dado en la determinación de la viabilidad celular.

2.4.- Análisis del potencial de membrana mitocondrial

Para la determinación del potencial de membrana se utilizó el fluoróforo éster metílico de tetrametilrodamina (TMRM) a una concentración de 100 nM en pocillo, se leyó la fluorescencia a los 15 minutos mediante el mismo fluorímetro a una longitud de onda de excitación de 552 nm y 576 nm de emisión.

Las medidas de fluorescencia fueron corregidas con el número de células por pocillo dado en la determinación de la viabilidad celular.

2.5.- Análisis de la producción de ROS

La determinación de la producción de ROS de las células se realizó mediante el método de Amplex®Red desarrollado por Invitrogen (Life Technologies™). Este método consiste en la medición del peróxido de hidrógeno de la muestra, ya que la oxidación del H_2O_2 que lleva a cabo la peroxidasa de rábano (HRP) convierte el N-acetil-3,7-dihidroxi-fenoxazina (Amplex® Red) incoloro en resorufina, molécula fluorescente (*figura 4*).

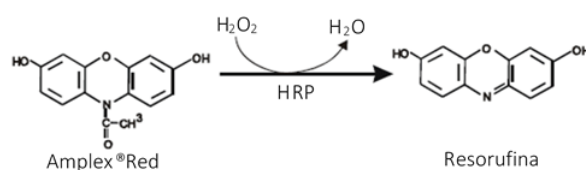


Figura 4: Reacción de conversión del Amplex®Red en resorufina por la HRP.

Para ello se eliminó el medio de cultivo de la placa p96, se añadió el tampón de Krebs/Ringer (KCl 145 mM, Hepes 30 mM, KH_2PO_4 5 mM, MgCl 3 mM, EGTA 0.1 mM, BSA 0.1%, pH 7.4), el reactivo Amplex®Red 10 μM y la HRP 0.2 U/mL en cada pocillo. Se dejó incubar una hora a 37°C y se leyó la fluorescencia cada 30 minutos durante 90 minutos en el fluorímetro lector de microplacas FLx800 (BIO-TEK® Winooski, Vermont, USA) a una longitud de onda de excitación de 570 nm y 585 nm de emisión.

2.6.- Análisis estadístico

Los datos se representan como la media \pm el error estándar de la media (SEM). Las diferencias estadísticas fueron analizadas aplicando el test t-Student y la significancia estadística entre los tratamientos con y sin GEN se midió para $P < 0.05$.

3.- RESULTADOS

3.1.- Efectos de la GEN y los citotóxicos sobre la proliferación celular

Después de 48h de tratamiento con GEN, los citotóxicos y su combinación, se observó que la viabilidad celular aumentó o se mantuvo inalterada en todas las combinaciones excepto en las células T47D tratadas con GEN+TAM, donde se observó una disminución de cerca del 10% de la proliferación celular respecto del tratamiento solo con TAM. Estos resultados se muestran en la *figura 5*.

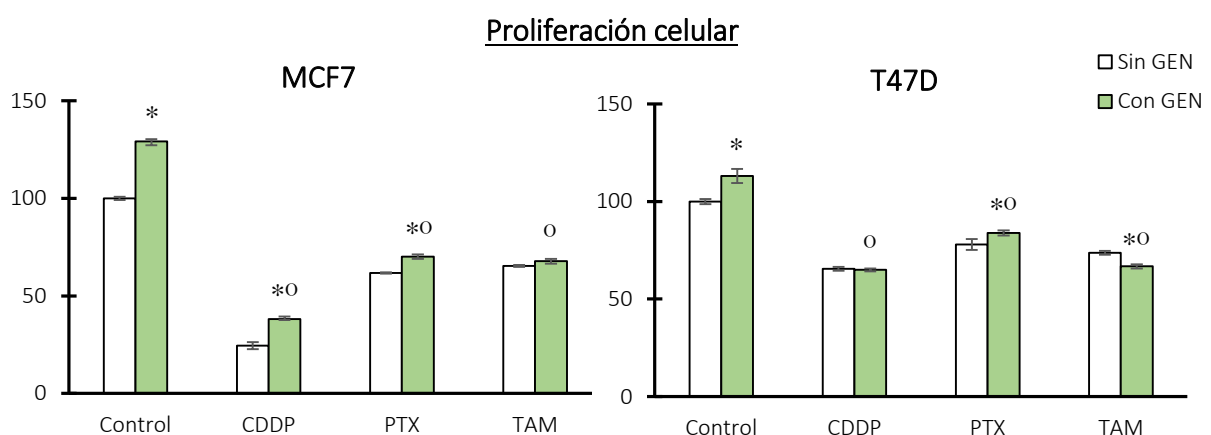


Figura 5: Efectos de la GEN, los citotóxicos y su combinación sobre la proliferación de las células de las líneas celulares MCF7 y T47D, el número de células se determinó mediante cristal violeta. Todas las medidas de proliferación fueron realizadas después de 48h de tratamiento con GEN (1 μ M), CDDP (10 μ M), PTX (10 nM), TAM (10 μ M), combinación GEN con cada uno de los citotóxicos, control de crecimiento en medio, o control con GEN (1 μ M). Los datos se representan como las medias \pm SEM de los porcentajes. Se indica la significancia entre control sin citotóxico y cada uno de los tratamientos con citotóxicos (°) y entre los tratamientos sin GEN y con GEN (*), calculada aplicando el test t-Student con una $P < 0.05$ y $n = 6$ o $n = 18$ (control).

La proliferación celular aumentó en los controles tratados con GEN en las dos líneas celulares. Sin embargo el crecimiento de las células control MCF7 tratadas con GEN fue mayor, cerca de un 29% más respecto del control no tratado, comparado con la proliferación de las T47D tratadas con GEN, con alrededor de un 13% de aumento respecto del control no tratado.

El CDDP se observó que inducía menor proliferación en las células de la línea MCF7 que en las T47D. No obstante el tratamiento coadyuvante con GEN+CDDP en MCF7 ocasionó una resistencia al tratamiento, que se determinó por el aumento en la proliferación de las células sometidas al tratamiento combinado respecto de las células MCF7 tratadas únicamente con CDDP. Este tratamiento coadyuvante no ocasionó cambios significativos en la viabilidad de las células T47D.

El PTX también indujo disminución de la proliferación y crecimiento celular en ambas líneas celulares, aunque la disminución fue mayor en las células MCF7 que en las T47D. En este caso el tratamiento combinado GEN+PTX contribuyó a la aparición de resistencia también en ambas líneas celulares, sin embargo la resistencia fue mayor en las MCF7 que en las T47D, ya que se observó un aumento en la proliferación de cerca del 12% en las MCF7 tratadas con GEN+PTX respecto de las células tratadas únicamente con PTX. El aumento observado en las T47D no superó el 7%.

El tratamiento con TAM nuevamente produjo una proliferación menor en las células de la línea MCF7, aunque las T47D también respondieron correctamente al tratamiento. Aquí no se observaron cambios significativos en la viabilidad de las células MCF7 tratadas únicamente con TAM o sometidas al tratamiento coadyuvante GEN+TAM, sin embargo en las células T47D tratadas con GEN+TAM se determinó una reducción de la viabilidad de más del 9% respecto de las tratadas únicamente con TAM.

3.2.- Efectos de la GEN y los citotóxicos sobre la apoptosis celular

El contenido lisosomal, medida de la apoptosis celular, en general no varía en los tratamientos combinados, sin embargo los niveles de apoptosis son muy superiores en el tratamiento con TAM como se puede observar en la *figura 6*.

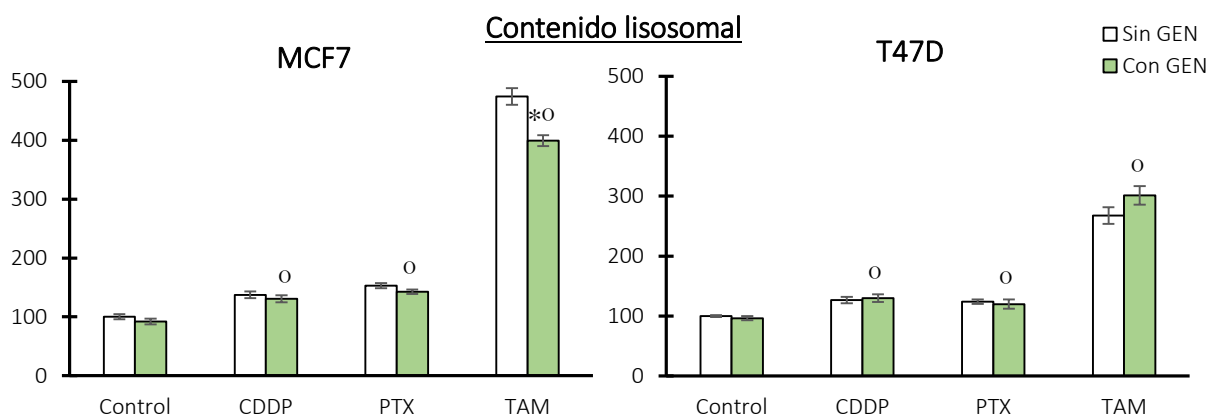


Figura 6: Efectos de la GEN, los citotóxicos y su combinación sobre el contenido lisosomal de las células de las líneas celulares MCF7 y T47D, esta determinación se realizó mediante el uso de la sonda fluorescente monodancil cadaverina (MDC). Todas las medidas de apoptosis fueron realizadas después de 48h de tratamiento con GEN (1 μ M), CDDP (10 μ M), PTX (10 nM), TAM (10 μ M), combinación GEN con cada uno de los citotóxicos, control de crecimiento en medio, o control con GEN (1 μ M). Los datos se representan como las medias \pm SEM de los porcentajes. Se indica la significancia entre control sin citotóxico y cada uno de los tratamientos con citotóxicos (°) y entre los tratamientos sin GEN y con GEN (*), calculada aplicando el test t-Student con una $P < 0.05$ y $n = 4$.

La apoptosis en los tratamientos con CDDP y con PTX es muy baja tanto en MCF7 como en T47D, sin embargo ambos tratamientos con TAM supusieron una elevación significativa de la apoptosis lo que se puede relacionar con sus respectivos mecanismos de acción. Además la suplementación coadyuvante con GEN no mostró diferencias significativas en T47D en ningún caso, no obstante en MCF7 la apoptosis disminuyó de manera notable con el tratamiento combinado de GEN+TAM, respecto a las células sometidas solamente a TAM.

3.3.- Efectos de la GEN y los citotóxicos sobre el potencial de membrana mitocondrial

Se han observado grandes diferencias en la línea MCF7, en cuanto al potencial de membrana mitocondrial, sin embargo en la T47D únicamente el tratamiento con CDDP lo aumentó (figura 7).

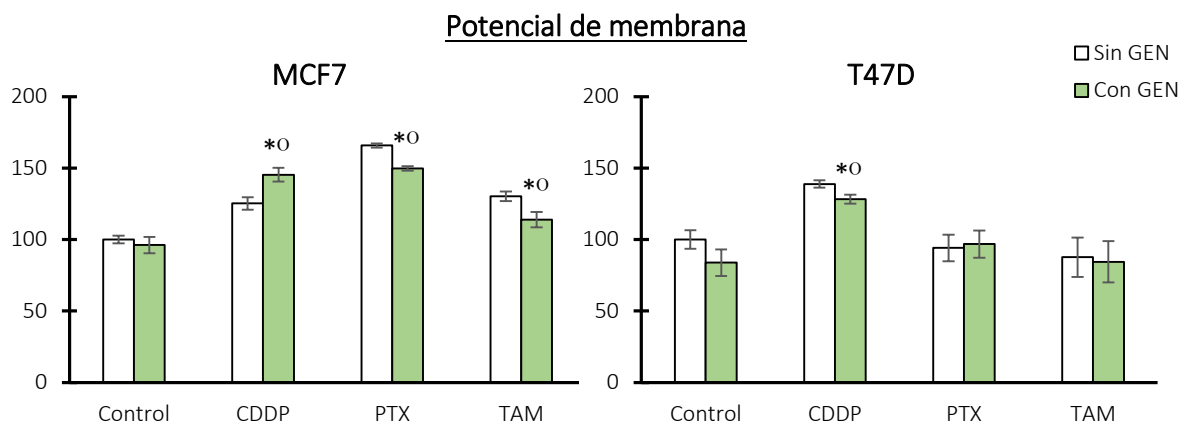


Figura 7: Efectos de la GEN, los citotóxicos y su combinación sobre el potencial de membrana mitocondrial de las células de las líneas celulares MCF7 y T47D, esta determinación se realizó mediante el uso de la sonda fluorescente éster metílico de tetrametilrodamina (TMRM). Todas las medidas fueron realizadas después de 48h de tratamiento con GEN (1 μ M), CDDP (10 μ M), PTX (10 nM), TAM (10 μ M), combinación GEN con cada uno de los citotóxicos, control de crecimiento en medio, o control con GEN (1 μ M). Los datos se representan como las medias \pm SEM de los porcentajes. Se indica la significancia entre control sin citotóxico y cada uno de los tratamientos con citotóxicos ($^{\circ}$) y entre los tratamientos sin GEN y con GEN (*), calculada aplicando el test t-Student con una $P < 0.05$ y $n = 3$.

La GEN parece no influir en el potencial de membrana mitocondrial en los controles de ninguna de las dos líneas celulares.

El tratamiento con CDDP en MCF7 parece aumentar el potencial de membrana y además la GEN se observó que lo aumentaba aún más respecto del tratamiento únicamente con CDDP. Sin embargo, en la línea celular T47D también se aumentó el potencial de membrana respecto del control, pero aquí la GEN lo disminuyó. Se observa un efecto inverso de la GEN en el tratamiento con CDDP en la MCF7 y la T47D.

En cambio el tratamiento con PTX de la línea MCF7 también aumentó el potencial de membrana respecto el control, pero la GEN disminuyó dicho potencial, lo que difiere de lo observado en el tratamiento coadyuvante con GEN y CDDP en esta línea celular. En la línea T47D el PTX parece no modificarlo y no se observan diferencias significativas respecto del control.

El tratamiento con TAM solo lo aumentó en las MCF7, en las T47D no se observan diferencias significativas respecto del control. Además en las MCF7 el tratamiento combinado GEN+TAM disminuyó notablemente el potencial de membrana, al igual que lo que se observó en el tratamiento GEN+PTX en esta línea celular.

3.4.- Efectos de la GEN y los citotóxicos sobre la producción de ROS

La producción de ROS aumenta después del tratamiento con todos los citotóxicos en ambas líneas celulares de forma significativa, en cambio los efectos de la GEN solo son visibles en la T47D tratada con citotóxicos y en la MCF7 control (*figura 8*).

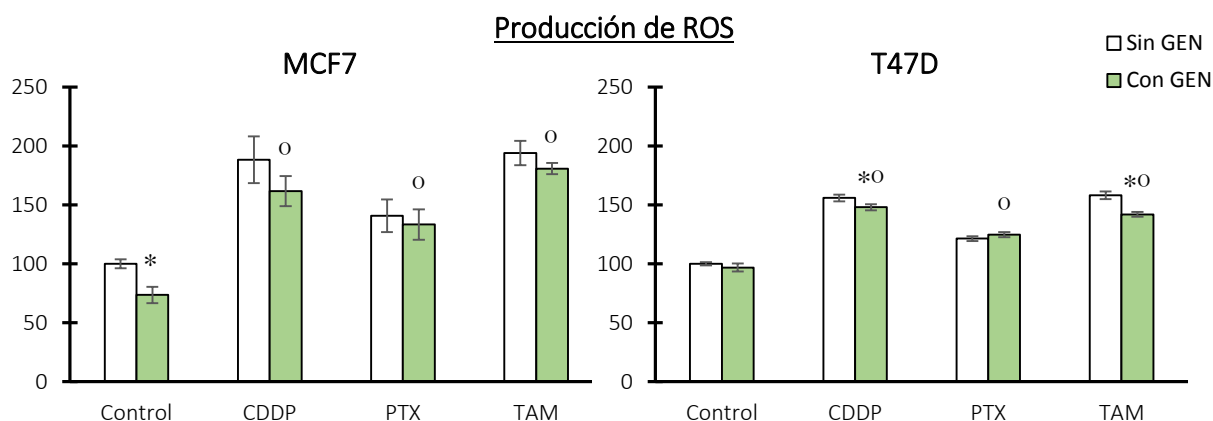


Figura 8: Efectos de la GEN, los citotóxicos y su combinación sobre la producción de ROS en las células de las líneas celulares MCF7 y T47D, esta determinación se realizó mediante el método Amplex®Red. Todas las medidas fueron realizadas después de 48h de tratamiento con GEN (1 μ M), CDDP (10 μ M), PTX (10 nM), TAM (10 μ M), combinación GEN con cada uno de los citotóxicos, control de crecimiento en medio, o control con GEN (1 μ M). Los datos se representan como las medias \pm SEM de los porcentajes. Se indica la significancia entre control sin citotóxico y cada uno de los tratamientos con citotóxicos (°) y entre los tratamientos sin GEN y con GEN (*), calculada aplicando el test t-Student con una $P < 0.05$ y $n=4$, $n=12$ (control).

En las células control de la línea MCF7 se observó que la GEN disminuía de forma significativa la producción de ROS, además se observó una tendencia también a la baja en los tratamientos combinados con GEN y citotóxicos respecto de la suplementación únicamente con el citotóxico.

En la línea T47D no hubo cambios en la producción de ROS en el control suplementado con GEN, sin embargo los tratamientos coadyuvantes de GEN+CDDP y GEN+TAM mostraron una bajada significativa respecto de los tratamientos con CDDP y TAM, respectivamente.

4.- DISCUSIÓN

Los efectos del tratamiento coadyuvante con GEN se ha demostrado que dependen en gran medida de la dotación de receptores estrogénicos y de la situación fisiológica del momento. Así se ha observado que la GEN ejerce un gran efecto sobre la línea celular con un ratio ER α /ER β alto y en cambio los efectos son mucho menores en la línea con un ratio ER α /ER β bajo.

Tal y como ya se había demostrado anteriormente la suplementación con GEN de las células con predominancia de ER α conduce a un aumento en la proliferación celular, quizá debido a que la producción de ROS en estas células está muy disminuida como consecuencia de la acción de la GEN²². Este hecho se podría explicar por la afinidad de la GEN por ER β que desplaza a E2 de este receptor evitando que se produzcan los efectos nocivos de este estrógeno, ya que E2 en MCF7 induce una disfunción mitocondrial que comporta un incremento de ROS²⁶. Así además se podrían activar algunos mecanismos antioxidantes que contribuirían a la supervivencia de las células, ya que no parece que ni la funcionalidad de la mitocondria ni la tasa de apoptosis se vea afectada por la GEN, al menos en MCF7.

En la línea celular T47D la GEN también indujo mayor proliferación celular, aunque en este caso en menor grado que las MCF7, además aquí la producción de ROS no se modificó por efecto de la GEN, estos efectos se podrían explicar por el hecho de que la presencia de E2 junto con la predominancia de ER β favorece la activación de ER β por encima de ER α , aunque ER α también estaría activo y por lo tanto también se induciría el crecimiento celular, aunque en menor grado que en las MCF7. Este hecho parece diferir con los resultados de estudios anteriores, ya que en general se indica que la GEN tiene efectos antiproliferativos y proapoptóticos sobre líneas celulares con un ratio ER α /ER β bajo, como las T47D²¹⁻²³. Esa disparidad quizá podría explicarse por el hecho de que esos estudios no trataban a las células con GEN y E2 a la vez, con lo que solo se apreciarían los efectos beneficiosos de la GEN sobre ER β . Al menos así se desprende de un reciente estudio en el que se determinaron los efectos de la GEN sobre la línea MCF7 con y sin estrógenos, los resultados obtenidos fueron notables, ya que la GEN en presencia de E2 inducía proliferación, mientras que la GEN sin E2 indujo inhibición del crecimiento y apoptosis.²⁷

El CDDP como se ha comentado anteriormente induce daño en el ADN tanto nuclear como mitocondrial, por lo que la replicación del ADN se vería comprometida y con ella la división celular¹⁵, ya que como se observa en los resultados (*figura 6*) el CDDP no ocasionó un incremento en la apoptosis celular, sin embargo sí que se observó una fuerte disminución de la viabilidad celular tanto en MCF7 como en T47D (*figura 5*), por lo tanto el CDDP ocasiona mayoritariamente una inhibición del crecimiento celular, causado precisamente por la inhibición de la replicación celular. Además el daño en el ADNmt conduciría a la disfunción de la cadena respiratoria con lo cual la producción de ROS se vería enormemente aumentada¹⁴. A pesar de ello, la acción del CDDP es mayor sobre las células MCF7, ya que las T47D al tener predominancia de ER β favorece que E2 se una a él y por lo tanto se podría inducir la expresión de enzimas antioxidantes como MnSOD que explicarían la producción de ROS menor en T47D que en MCF7, lo que explicaría a su vez la proliferación mayor que se aprecia en las T47D tratadas con CDDP respecto de las MCF7.^{24,25}

Así mismo, el mecanismo de acción del PTX no conduce de manera directa a la muerte celular por apoptosis, ya que el PTX se une a los microtúbulos estabilizando su estructura, inhibiendo así la despolimerización y funcionalidad del citoesqueleto¹⁵. Con lo cual no se observaron unos niveles de apoptosis enormemente aumentados, puesto que el PTX inhibe el crecimiento celular restringiendo el ciclo celular en la fase M, además la producción de ROS también se aumentó ya que, como se comentó anteriormente, el PTX induce la actividad de la NOX¹⁶. Nuevamente la producción de ROS (*figura 8*) fue algo mayor en las MCF7 que en las T47D, lo que se podría explicar por el mismo efecto del ER β indicado en el caso del CDDP.

La acción citotóxica del TAM queda clara con los resultados obtenidos, ya que en las MCF7 es capaz de aumentar en cerca de un 400% el contenido lisosomal respecto del control o los otros tratamientos con CDDP y PTX. El TAM en MCF7 se une a ER α antagonizando la acción de E2 e induciendo la expresión de genes proapoptóticos, ya que esta unión provoca un cambio conformacional que permite la unión del complejo TAM-ER α a regiones del ADN no ERE. Sin embargo en T47D el TAM deberá unirse preferencialmente a ER β , debido a su predominancia en esta línea celular, teniendo en este caso una acción agonista e induciendo la activación de genes antiproliferativos más que proapoptóticos^{17,18}, explicando así los niveles más bajos de apoptosis de las T47D respecto de las MCF7. Así mismo TAM también es capaz de inducir daño

oxidativo a través de la estimulación de la mtNOS^{18,19}, nuevamente la menor producción de ROS en las T47D se podría explicar por la expresión de enzimas antioxidantes por parte del ER β .

El tratamiento coadyuvante de GEN con CDDP parece no ser beneficioso para combatir las células cancerosas en las MCF7, ya que contribuye a la disminución de la producción de ROS y mejora la funcionalidad mitocondrial confiriendo mayor resistencia a la célula frente al tratamiento citotóxico. Este hecho parece estar mediado por ER α , si bien es cierto que el mecanismo aún no está del todo claro²⁸, parece lógico pensar que pueda ser debido al desplazamiento de E2 que llevaría a cabo la GEN sobre los ER, de esta manera se limitarían los efectos nocivos del E2 potenciándose a su vez los efectos protectores de la GEN.

Igualmente el tratamiento combinado GEN+PTX parece aumentar la proliferación de las células MCF7, y es que se ha observado que la GEN disminuye la capacidad del PTX para polimerizar los microtúbulos de forma estable, además de reducir la expresión de las quinasas ciclina B1 y CDC2 que se encargan de la fosforilación, y por lo tanto inhibición, de Bcl-2. Eso conlleva la disminución de la apoptosis mediada por PTX.²⁹

Sin embargo, el tratamiento con GEN y TAM en ambas líneas celulares parece no tener efectos negativos sino más bien positivos para combatir las células tumorales, ya que en las MCF7 no parece haber diferencias significativas entre los tratamientos con TAM y la combinación, este hecho podría deberse a que la GEN activa preferencialmente ER β mientras el TAM induce efectos antagonistas sobre ER α , con todas las consecuencias ya mencionadas. En cambio en las T47D se potencia la acción del TAM, ya que tanto el TAM como la GEN inducen acciones proapoptóticas o antiproliferativas. Así lo demostraron Lattrich et al. [2013] aplicando un tratamiento combinado de TAM y diversos agonistas de ER β , donde se observó que se mejoraba el efecto del TAM activando o inhibiendo una serie de genes que participan en la regulación del crecimiento celular.³⁰

5.- CONCLUSIONES

Como se ha podido determinar en este estudio la acción de la GEN depende en gran medida del ratio ER α /ER β de la célula mamaria.

Así pues, el tratamiento coadyuvante con GEN nunca parece ser recomendado para las mujeres con una dotación de ER mayoritariamente α , ya que por lo general la GEN confiere resistencia a la célula cancerosa frente a los tratamientos citotóxicos examinados. Sin embargo, en el caso de mujeres con diferente dotación de ER, donde haya una predominancia de ER β , el tratamiento combinado de TAM y GEN podría llegar a ser beneficioso en la lucha contra el cáncer.

A pesar de eso, el papel que juegan ambos receptores de estrógenos en la inducción del cáncer de mama aún no está del todo claro y es necesaria más investigación para determinar cuán importantes son estos receptores y en especial cuál puede ser el efecto beneficioso de la genisteína en el tratamiento del cáncer de mama con una dotación mayoritaria de ER β .

6.- BIBLIOGRAFIA

1. Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer*. 2013;49(6):1374-1403.
2. Burns KA, Korach KS. Estrogen receptors and human disease: An update. *Arch Toxicol*. 2012;86(10):1491-1504.
3. Hartz AJ, He T. Cohort study of risk factors for breast cancer in post menopausal women. *Epidemiol Health*. 2013;35:e2013003.
4. Althuis MD, Fergenbaum JH, Garcia-Closas M, Brinton LA, Madigan MP, Sherman ME. Etiology of hormone receptor-defined breast cancer: A systematic review of the literature. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2004;13(10):1558-1568.
5. Lahmann PH, Hoffmann K, Allen N, et al. Body size and breast cancer risk: Findings from the European prospective investigation into cancer and nutrition (EPIC). *Int J Cancer*. 2004;111(5):762-771.
6. Polyak K. Breast cancer: Origins and evolution. *J Clin Invest*. 2007;117(11):3155-3163.
7. Pearce ST, Jordan VC. The biological role of estrogen receptors alpha and beta in cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2004;50(1):3-22.
8. Fox EM, Davis RJ, Shupnik MA. ERbeta in breast cancer--onlooker, passive player, or active protector? *Steroids*. 2008;73(11):1039-1051.
9. Leygue E, Murphy LC. A bi-faceted role of estrogen receptor beta in breast cancer. *Endocr Relat Cancer*. 2013;20(3):R127-39.
10. Higa GM, Fell RG. Sex hormone receptor repertoire in breast cancer. *Int J Breast Cancer*. 2013;2013:284036.
11. Morani A, Warner M, Gustafsson JA. Biological functions and clinical implications of oestrogen receptors alpha and beta in epithelial tissues. *J Intern Med*. 2008;264(2):128-142.
12. Jonsson P, Katchy A, Williams C. Support of a bi-faceted role of estrogen receptor beta (ERbeta) in ERalpha-positive breast cancer cells. *Endocr Relat Cancer*. 2014;21(2):143-160.
13. National Center for Biotechnology Information. *PubChem Compound Database*. CID=2767;<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?sid=46504561> (Consultada el 28 de mayo de 2014).
14. Marullo R, Werner E, Degtyareva N, et al. Cisplatin induces a mitochondrial-ROS response that contributes to cytotoxicity depending on mitochondrial redox status and bioenergetic functions. *PLoS One*. 2013;8(11):e81162.
15. National Center for Biotechnology Information. *PubChem Compound Database*. CID=36314;<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?sid=46506910> (Consultada el 28 de mayo de 2014).
16. Alexandre J, Hu Y, Lu W, Pelicano H, Huang P. Novel action of paclitaxel against cancer cells: Bystander effect mediated by reactive oxygen species. *Cancer Res*. 2007;67(8):3512-3517.
17. National Center for Biotechnology Information. *PubChem Compound Database*. CID=2733526;<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?sid=46505515> (Consultada el 28 de mayo de 2014).
18. Nazarewicz RR, Zenebe WJ, Parihar A, et al. Tamoxifen induces oxidative stress and mitochondrial apoptosis via stimulating mitochondrial nitric oxide synthase. *Cancer Res*. 2007;67(3):1282-1290.
19. Ghafourifar P, Cadenas E. Mitochondrial nitric oxide synthase. *Trends Pharmacol Sci*. 2005;26(4):190-195.

20. Prietsch RF, Monte LG, da Silva FA, et al. Genistein induces apoptosis and autophagy in human breast MCF-7 cells by modulating the expression of proapoptotic factors and oxidative stress enzymes. *Mol Cell Biochem*. 2014.
21. Hilakivi-Clarke L, Andrade JE, Helferich W. Is soy consumption good or bad for the breast? *J Nutr*. 2010;140(12):2326S-2334S.
22. Pons DG, Nadal-Serrano M, Del Mar Blanquer-Rossello M, Sastre-Serra J, Oliver J, Roca P. Genistein modulates proliferation and mitochondrial functionality in breast cancer cells depending on ERalpha/ERbeta ratio. *J Cell Biochem*. 2013.
23. Douglas CC, Johnson SA, Arjmandi BH. Soy and its isoflavones: The truth behind the science in breast cancer. *Anticancer Agents Med Chem*. 2013;13(8):1178-1187.
24. Borrás C, Gambini J, Gomez-Cabrera MC, et al. Genistein, a soy isoflavone, up-regulates expression of antioxidant genes: Involvement of estrogen receptors, ERK1/2, and NFkappaB. *FASEB J*. 2006;20(12):2136-2138.
25. Nadal-Serrano M, Pons DG, Sastre-Serra J, Blanquer-Rossello Mdel M, Roca P, Oliver J. Genistein modulates oxidative stress in breast cancer cell lines according to ERalpha/ERbeta ratio: Effects on mitochondrial functionality, sirtuins, uncoupling protein 2 and antioxidant enzymes. *Int J Biochem Cell Biol*. 2013;45(9):2045-2051.
26. Sastre-Serra J, Valle A, Company MM, Garau I, Oliver J, Roca P. Estrogen down-regulates uncoupling proteins and increases oxidative stress in breast cancer. *Free Radic Biol Med*. 2010;48(4):506-512.
27. Obiorah IE, Fan P, Jordan VC O. Breast cancer cell apoptosis with phytoestrogens is dependent on an estrogen deprived state. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2014.
28. Hu XJ, Xie MY, Kluxen FM, Diel P. Genistein modulates the anti-tumor activity of cisplatin in MCF-7 breast and HT-29 colon cancer cells. *Arch Toxicol*. 2014;88(3):625-635.
29. Liao CH, Pan SL, Guh JH, Teng CM. Genistein inversely affects tubulin-binding agent-induced apoptosis in human breast cancer cells. *Biochem Pharmacol*. 2004;67(11):2031-2038.
30. Latrich C, Schuler S, Haring J, Skrzypczak M, Ortmann O, Treeck O. Effects of a combined treatment with tamoxifen and estrogen receptor beta agonists on human breast cancer cell lines. *Arch Gynecol Obstet*. 2013.