



Receptor de estrógeno: Bases moleculares aplicadas a medicina

Diana C. Márquez¹.

¹Oncólogo Molecular dmarquez@ucla.edu

Correspondencia: Instituto de Medicina Tropical - Facultad de Medicina - Universidad Central de Venezuela.

Consignado el 31 de Diciembre del 2000 a la Revista Vitae Academia Biomédica Digital.

RESUMEN

Los estrógenos son hormonas que influencian el crecimiento, diferenciación y función de los órganos del sistema reproductor como la mama, útero y ovarios, pero que también tienen un efecto en tejidos no-reproductores como en los sistemas cardiovascular óseo y nervioso. Hasta hace sólo cinco años atrás se conocía un solo tipo de receptor de estrógeno (RE-a) y se pensaba que este era capaz de mediar todas las funciones inducidas por el estrógeno, incluyendo el control de la expresión de ciertos genes. Recientemente, un segundo receptor de estrógeno, (RE b) ha sido identificado y además ha sido demostrada la presencia de receptores estrogénicos en la membrana celular capaces de mediar los efectos rápidos, "no-genómicos" del estradiol. Esta revisión resume la estructura y los mecanismos principales de acción de los receptores de estrógeno y como el entendimiento de la fisiología de acción de estos receptores a nivel molecular permite el desarrollo de drogas altamente específicas y con menos efectos secundarios para el tratamiento de diversas patologías, entre las cuales se encuentran el cáncer de mama, la osteoporosis y la ateroesclerosis.

INTRODUCCIÓN

Los estrógenos cumplen una función vital en la fisiología reproductiva femenina y masculina estimulando el crecimiento y diferenciación celular en tejido mamario, útero, vagina, ovario, testículos, epidídimos y próstata (1). Además, los estrógenos participan en la fisiología cardiovascular.

Es ampliamente conocido que el riesgo de enfermedad cardiovascular es menor en mujeres que en hombres antes de la menopausia (2), así como la progresión de enfermedad renal es más rápida en el período posmenopáusico en mujeres (3). Despues de la menopausia los niveles de estradiol-17b (E2), el estrógeno que predomina en la circulación antes de la menopausia, disminuyen a las concentraciones observadas en hombres de edad similar (4). Estudios epidemiológicos han demostrado que, en mujeres, esa diferencia en la resistencia del riñón al progreso de la enfermedad es debida a la presencia de estradiol-17b (3,5).

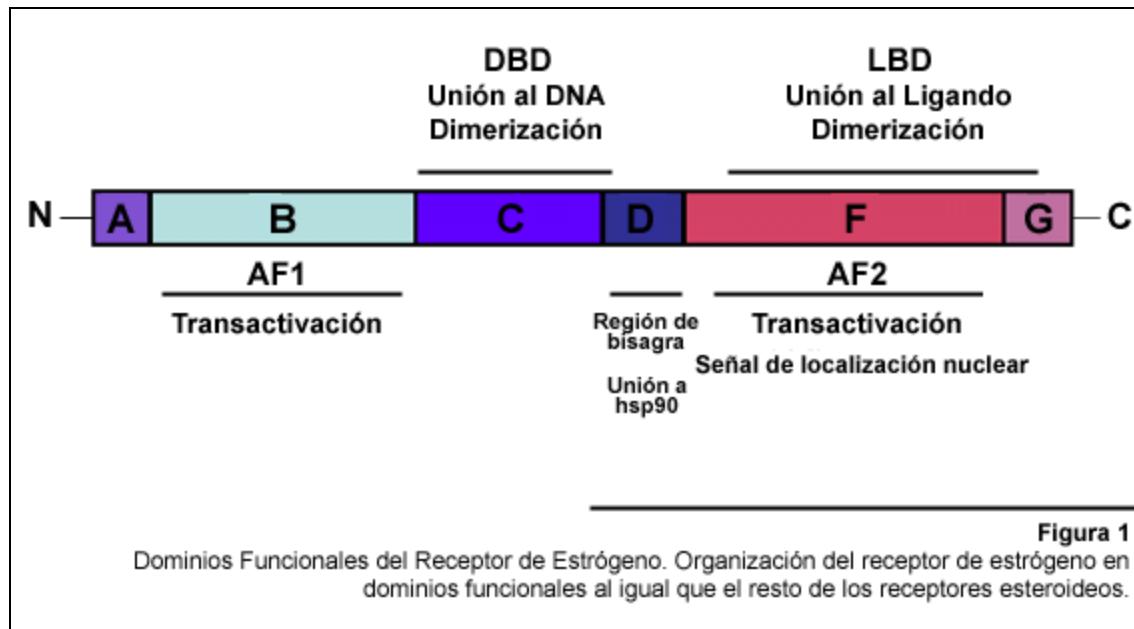
Así mismo, los estrógenos son de importancia crítica en el desarrollo y mantenimiento de la densidad ósea. Igualmente, los estrógenos son requeridos para el crecimiento y diferenciación neuronal, y están relacionados a funciones cognitivas y de estado de ánimo. Estudios prospectivos han demostrado que los estrógenos pueden ser útiles en la prevención o retardo en la aparición de las enfermedades degenerativas del sistema nervioso como en la enfermedad de Alzheimer (6).

ESTRUCTURA DEL RECEPTOR DE ESTRÓGENO

El receptor de estrógeno (RE) es una proteína perteneciente a la "súper familia de receptores nucleares", la cual incluye otros receptores de hormonas esteroideas, el receptor de la vitamina D, retinoides, hormona tiroidea y algunos receptores huérfanos (7). El receptor de estrógeno fue identificado hace aproximadamente 40 años, en 1962 Jensen et al. describieron la presencia de sitios de unión de estrógeno en diferentes tejidos de ratas (8). Cuatro años mas tarde, Toft y Gorski aislaron por primera vez receptores de estrógeno del útero de ratas (9). Ambos grupos desarrollaron distintos modelos para explicar como el estradiol lleva a cabo su acción a nivel del núcleo al unirse a un receptor específico, el receptor de estrógeno. Desde entonces el RE ha sido ampliamente estudiado. Hasta hace pocos años se pensaba que todos los efectos debidos a estrógenos eran mediados por un solo RE, sin embargo, en 1996 fue descubierto un nuevo receptor por lo que se decidió denominarlos RE-b (10) al recientemente descubierto y RE-a al previamente conocido. En consecuencia, el nuevo conocimiento incrementó significativamente la complejidad de la fisiología de los estrógenos, sin mencionar que existen también receptores en membrana que median igualmente funciones de estas hormonas, a los cuales nos referiremos mas adelante.

Ambos receptores poseen funciones diferentes de acuerdo al tejido donde ejercen su acción. En general, esta revisión se referirá al RE-a por ser el mas conocido y estudiado. Funcionalmente, el RE-a, al igual que el resto de los receptores esteroideos, está organizado en 6 dominios denominados por letras de la "A" a la "F". La región A/B está localizada en el lado amino terminal (Figura 1) de la proteína y es la región menos conservada entre los distintos receptores nucleares. Este dominio contiene una función de activación de la transcripción génica (Activation Function 1 o AF-1) y varios sitios de fosforilación que son importantes en el proceso de activación de la proteína especialmente en los procesos donde el receptor es activado en ausencia de hormona (11-13). Adyacente se encuentra la región de unión al ADN o dominio C, la mas conservada entre los diferentes receptores nucleares compuesta por nueve residuos de cisteínas que son

invariablemente conservados entre los diferentes receptores esteroideos, de los cuales, ocho están ordenados alrededor de dos iones de Zn^{2+} para formar dos dedos de zinc que le confieren al receptor la capacidad de unirse específicamente al ADN. La unión a una secuencia específica en el ADN está determinada por la composición de aminoácidos localizada entre estos dos dedos de zinc, conocida como la caja P (P-box) (14). Entre la región de unión al ADN y el dominio E/F, se encuentra la región D o región de bisagra, la cual no ha sido bien caracterizada y participa en la unión a la proteína chaperona de choque térmico hsp90 (heat shock protein 90), la cual permanece unida al receptor mientras éste se encuentre en un estado inactivo. Finalmente, en el extremo carboxiterminal se encuentra la región E/F o dominio de unión al ligando (LBD), donde se une la hormona (E2). Esta región a pesar que es conservada entre los diferentes receptores esteroideos es altamente específica para su hormona, es decir que el receptor de estrógeno une estrógeno con alta afinidad, pero no otras hormonas esteroideas. Otras funciones de este dominio incluyen una función de activación de la transcripción o AF-2 (Activation Function 2), dimerización, interacción con otras proteínas co-activadoras o co-represoras de la transcripción, fosforilación y localización nuclear.



EFFECTOS "GENÓMICOS" DEL RECEPTOR DE ESTRÓGENO

La teoría clásica de acción de las hormonas esteroideas establece que el receptor esteroideo, es activado al unir su ligando, en este caso el estradiol 17-b (E2), y actúa como un factor transcripcional al unirse al ADN estimulando la transcripción de ciertos genes, de ahí el nombre de receptores nucleares, ya que ejercen su acción a nivel del núcleo (7,15). Este modo de acción de los esteroides ha sido denominado "genómico" (16) ya que requiere la activación del receptor al unir su hormona específica después de haber atravesado la membrana, la homo o heterodimerización (dos RE-a o un RE-a se heterodimeriza con un RE-b) del complejo hormona-receptor y el reconocimiento de una secuencia específica en el ADN o elemento de respuesta a estrógeno (ERE) (17)(Figura 2). En consecuencia, el proceso de transcripción es activado al formarse el complejo de iniciación de la transcripción que incluye diferentes co-activadores, co-represores y proteínas reguladoras de la transcripción.

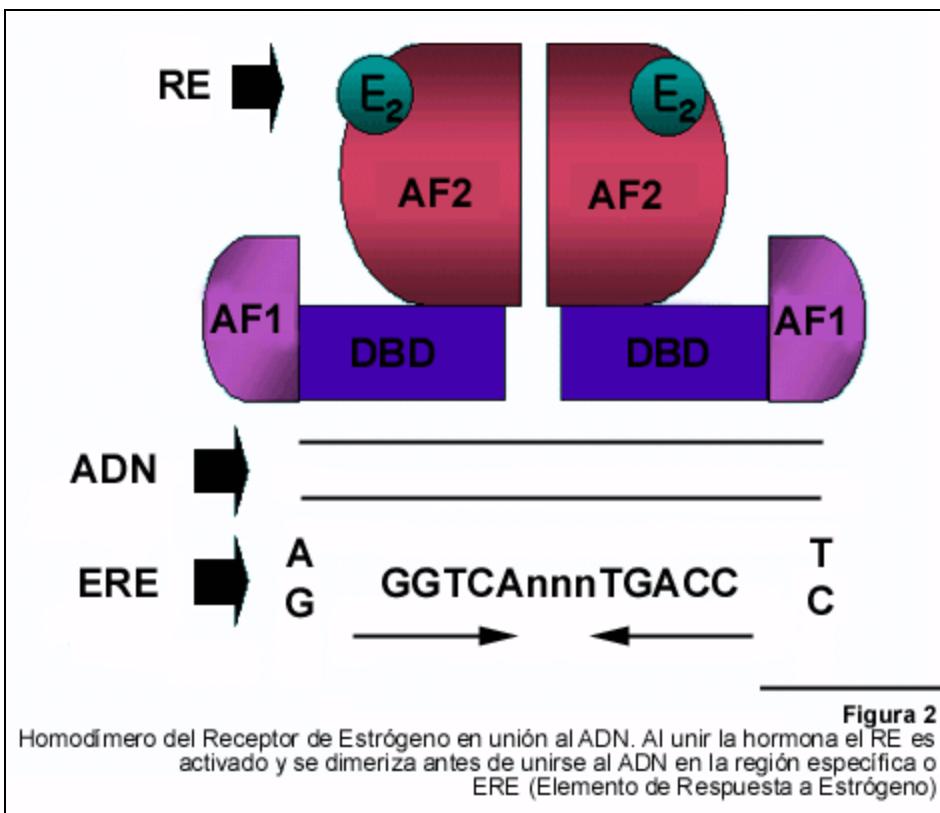


Figura 2

Homodimero del Receptor de Estrógeno en unión al ADN. Al unir la hormona el RE es activado y se dimeriza antes de unirse al ADN en la región específica o ERE (Elemento de Respuesta a Estrógeno)

La transcripción estimulada por el RE es finamente regulada dependiendo del tejido donde ocurre. Este control tan específico parece depender de la composición del complejo de iniciación de la transcripción (figura 3) (18). Un grupo de factores transcripcionales basales interactúa con el complejo hormona-receptor para formar un complejo de preiniciación al cual se le van a unir una serie de proteínas co-reguladoras llamadas proteínas de interacción con receptores o RIPs (Receptor Interacting Proteins). Estos co-reguladores pueden activar (co-activadoras) o represar (co-represoras) la transcripción. Este proceso, donde se induce la síntesis de ARN que resulta en la producción final de nuevas proteínas, requiere usualmente de por lo menos 1-2 horas después de iniciado el tratamiento con la hormona (Figura 4).

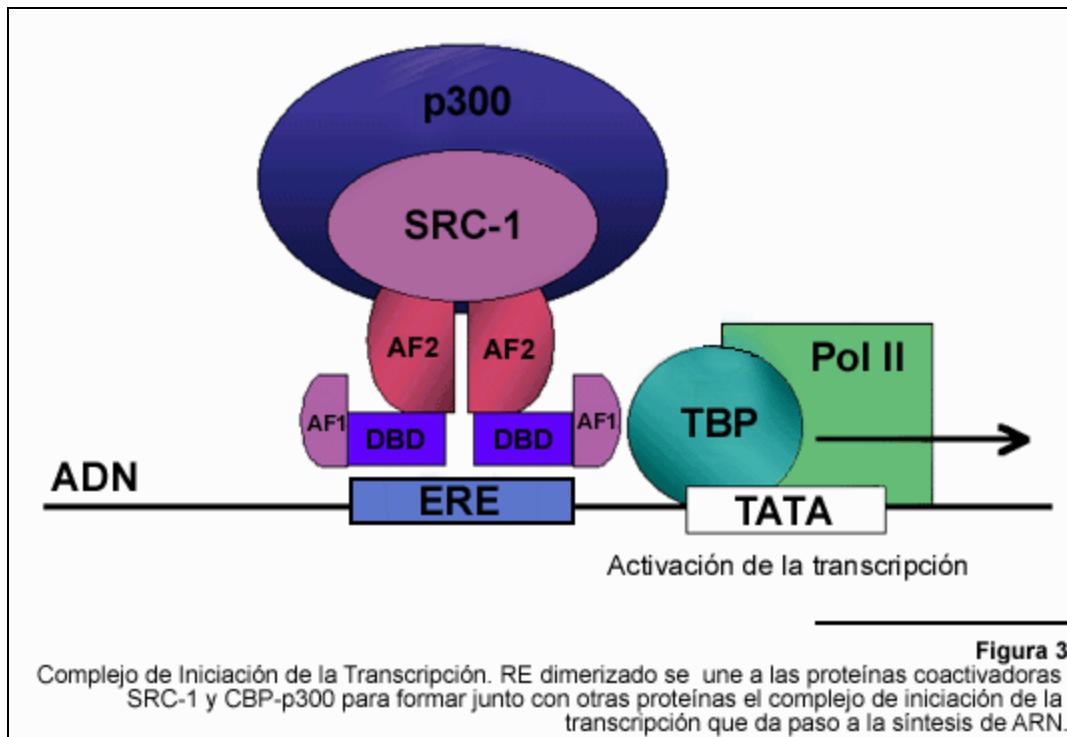


Figura 3
Complejo de Iniciación de la Transcripción. RE dimerizado se une a las proteínas coactivadoras SRC-1 y CBP-p300 para formar junto con otras proteínas el complejo de iniciación de la transcripción que da paso a la síntesis de ARN.

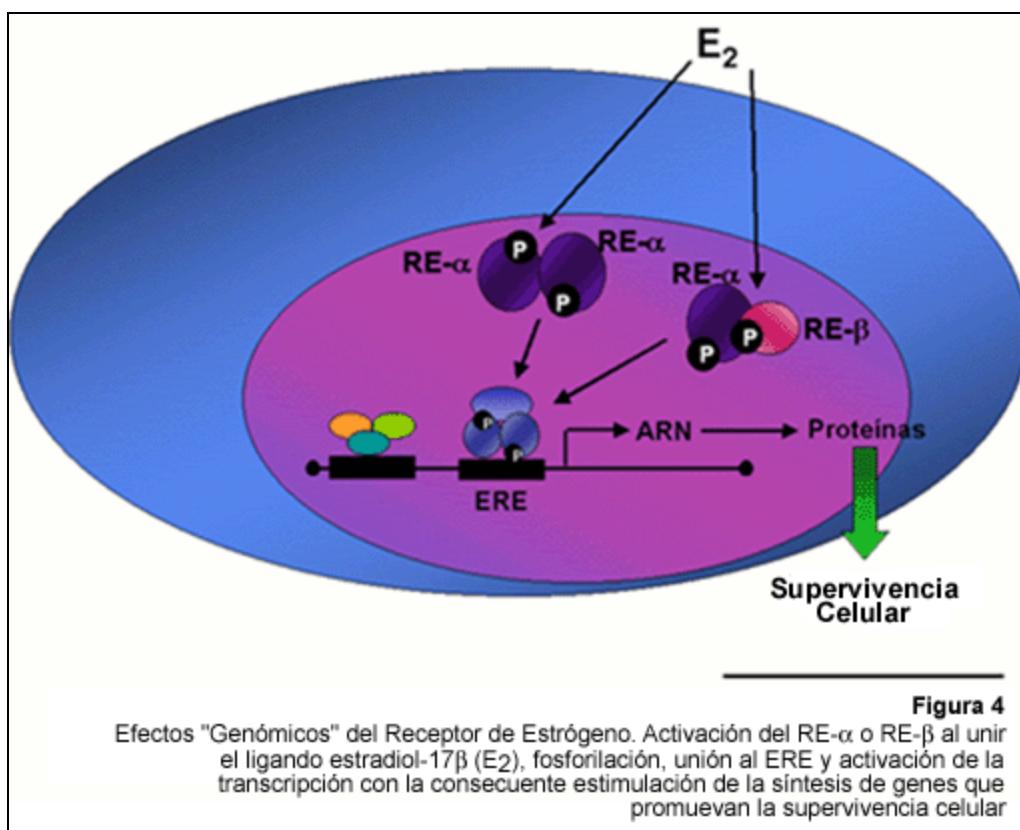
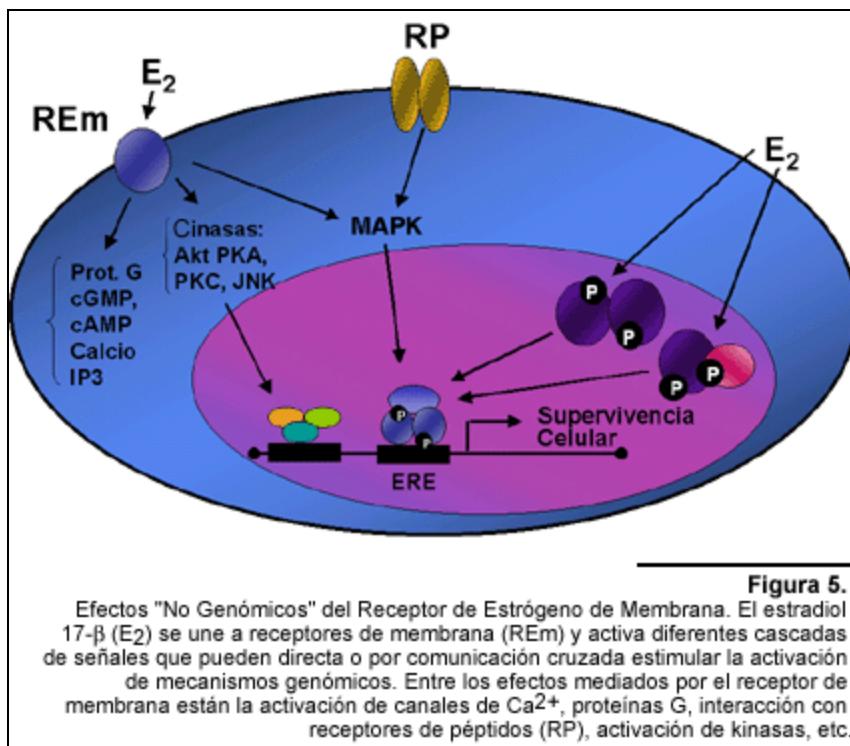


Figura 4
Efectos "Genómicos" del Receptor de Estrógeno. Activación del RE- α o RE- β al unir el ligando estradiol-17 β (E2), fosforilación, unión al ERE y activación de la transcripción con la consecuente estimulación de la síntesis de genes que promuevan la supervivencia celular

EFFECTOS "NO GENÓMICOS" DEL RECEPTOR DE ESTRÓGENO

El modo de acción "no-genómico" del estrógeno y en general de todas las hormonas esteroideas es un proceso rápido, que ocurre en unos pocos segundos o minutos y no requiere de los procesos de transcripción y síntesis de nuevas proteínas, para poder producir su efecto primario, por esta razón debe ser mediado por un receptor localizado en la membrana. Entre estos efectos

rápidos se encuentran flujos de iones, desencadenamiento de potenciales de acción, descarga de vesículas secretoras o activación de proteínas cinasas asociadas a la membrana, todos estos procesos ocurren en unos pocos segundos o minutos (Figura 5) (16,19-23).



Este fenómeno de respuesta fisiológica rápida ante un esteroide fue descrito por primera vez en 1942 cuando Hans Seyle quien observó en pacientes efectos anestésicos casi inmediatos después de la administración de progesterona. En 1967, Szego y Davis describieron por primera vez la idea de que el estrógeno podía inducir efectos rápidos, "no-genómicos", al demostrar el aumento en la producción de AMP cíclico (cAMP) in vivo, pocos segundos después del tratamiento con estradiol (24). En 1977, Pietras y Szego demostraron la presencia de sitios específicos de unión a estrógeno en la superficie de células endometriales y mas tarde lograron purificar receptores de estrógeno de membranas celulares provenientes de hepatocitos (25-27). Sin embargo, a pesar que estos efectos rápidos mediados por esteroides fueron descritos hace ya algún tiempo, la mayor atención en los últimos 30 años ha sido dedicada a estudiar los efectos genómicos mediados por estos receptores, debido principalmente a la imposibilidad de aislar y caracterizar a los receptores de membrana que median los efectos rápidos a hormonas esteroideas.

Hasta el momento, utilizando diferentes procedimientos se ha demostrado la presencia de receptores estrogénicos de membrana (REm) en distintos tejidos y líneas celulares. En nuestro laboratorio y en trabajos previamente publicados, utilizando E2-BSA-FITC (estradiol 17-β acoplado a albúmina y fluoresceína), un compuesto impermeable incapaz de penetrar la membrana, demostramos su presencia en una línea celular de adenocarcinoma de mama, MCF-7 (Figura 6) (28,29). También, utilizando el mismo compuesto se demostró la presencia de REm en células endoteliales (30) y en células CHO (células de ovario de Hamster) transfectadas con el gen del RE-a o RE nuclear (31), lo que sugirió que el REm podría originarse del mismo gen del receptor nuclear. Sin embargo no se describieron en este estudio los mecanismos por los cuales el receptor es dirigido hacia la membrana (31).

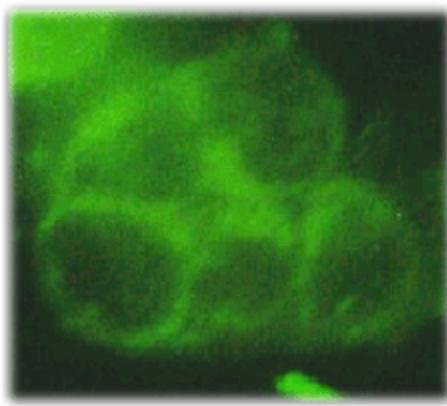


Figura 6

Tinción del Receptor de Estrógeno de Membrana utilizando E2-BSA-FITC en Células MCF-7 de cáncer de mama. Células MCF-7, cultivadas en ausencia de estrógeno, fueron incubadas, sin fijación previa, en presencia de un compuesto incapaz de penetrar la membrana, E2-BSA-FITC. Utilizando microscopía de fluorescencia se observa un halo fluorescente alrededor de las células.

Efectos no-genómicos mediados por el Receptor de Estrógeno de Membrana

- Útero: la primera demostración de sitios específicos de unión a estrógeno fue realizada en células uterinas aisladas de rata en 1977 (25). Entre las funciones principales del RE de membrana en el útero están la activación de una o mas cascadas de señales que puedan facilitar la absorción de compuestos mediada por hormonas y la posibilidad de que la unión de la hormona a la membrana represente una manera de transportar el E2 en vesículas endocíticas hasta el núcleo para que ejerza su función nuclear (32).
- Estimulación en la producción de corrientes de Calcio y nucleótidos cíclicos: en células beta pancreáticas el E2 puede estimular el incremento en Ca^{2+} intracelular inducido por glucosa y los niveles de GMP cíclico (cGMP), esto sucede pocos segundos después de estimular con E2 y es un mecanismo que ocurre por asociación del RE con la guanilato ciclase (GC) de la membrana celular. En monocitos, la producción de una corriente de Ca^{2+} después de estimular con E2, induce la producción de óxido nítrico (NO), ambos eventos ocurren en 40 segundos (33). En células endoteliales el estrógeno o el compuesto impermeable a la membrana celular E2-BSA (estradiol 17-b acoplado a albúmina) puede estimular la producción de cGMP y NO y activar además cinasas celulares (34,35). Aumentos en cAMP han sido descritos también en células de cáncer de mama, células uterinas y músculo liso (36,37).
- Sistema Cardiovascular: los mecanismos protectores de los estrógenos en el sistema cardiovascular son mediados por ambos receptores estrogénicos, tanto el nuclear como el de membrana (4,21). E2 tiene efectos rápidos que ayudan a preservar el flujo coronario, incluyendo la estimulación de la óxido nítrico sintetasa y la consecuente producción de NO y cGMP. E2 además inhibe canales de Ca^{2+} en músculo liso vascular (38), reduciendo de esa manera la acción de ciertos vasoconstrictores que actúan a través de este mecanismo. Todo esto resulta en vasodilatación y mejor perfusión del corazón.
- Sistema Óseo: la deficiencia de estrógeno está asociada a una pérdida ósea significativa. Existe evidencia de la presencia de sitios de unión y efectos agudos a estrógeno en osteoblastos y osteoclastos, como aumentos de Ca^{2+} intracelular, inositol (1,4,5) trifosfato y diacilglicerol, cAMP, cGMP, así como la activación de la Cinasa de Proteínas Activadora de Mitogenesis o MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) (19,39).

- Sistema Nervioso Central: utilizando diferentes modelos de isquemia cerebral tanto *in vitro* como *in vivo* se ha demostrado que el E2 es capaz de preservar tanto las neuronas como el endotelio neurovascular, además de limitar la extensión de la lesión y disminuir la mortalidad (40). El uso de estrógeno después de la menopausia resulta en una mejoría de las funciones cognitivas y en una reducción de la incidencia de enfermedad de Alzheimer. En pacientes con síndrome de Turner mejora las funciones motoras. En las células de pituitaria GH3/B6, es capaz de estimular la secreción de prolactina a través de la inducción de potenciales de acción (41). Todos estos procesos son debidos a efectos rápidos, mediados por receptores de membrana capaces de activar cascadas de señales que si bien producen efectos que pueden ser medidos en pocos segundos o minutos, estos efectos rápidos muchas veces terminan en la activación de procesos "genómicos" y la inducción o inhibición de la expresión de ciertos genes.

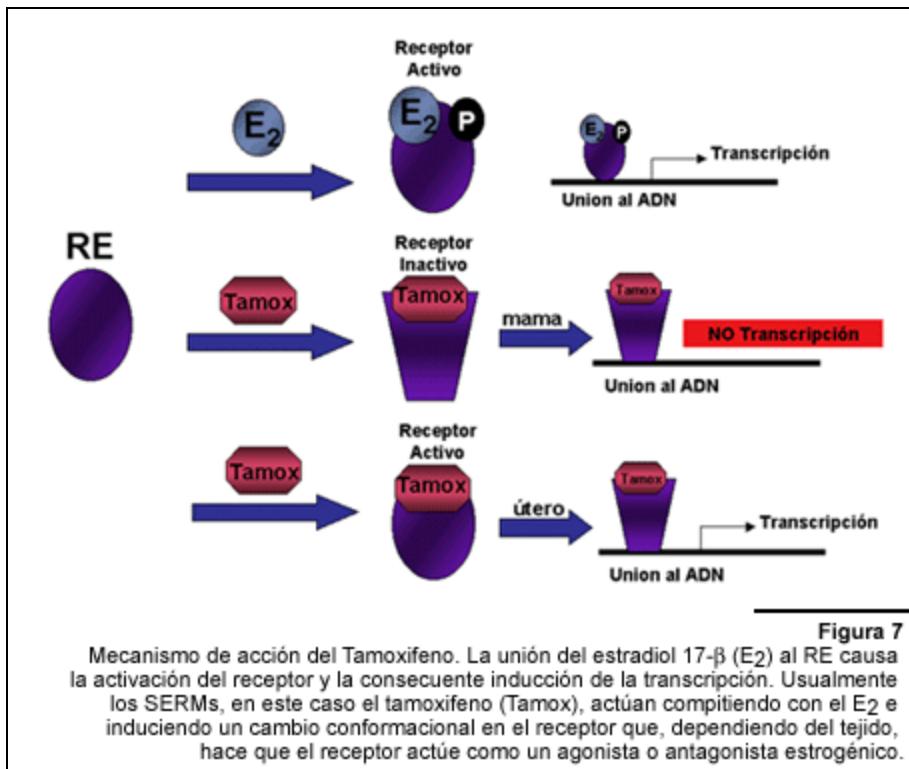
SERMS- MODULADORES SELECTIVOS DEL RECEPTOR DE ESTRÓGENO

En el tratamiento de los síntomas asociados con la menopausia se han utilizado estrógenos por mas de 50 años. Actualmente, es sorprendente que a pesar de los beneficios que ofrece la terapia hormonal sustitutiva, es relativamente bajo el número de mujeres que inicia esta terapia y la que la inicia, usualmente no permanece en ella por mas de un año, en gran parte debido a que los estrógenos incrementan significativamente el riesgo a desarrollar cáncer de mama y útero. En consecuencia, nació la necesidad de crear drogas que conserven la función beneficiosa del estrógeno en los sistemas cardiovascular, nervioso y hueso, pero sin la función negativa que ejercen sobre la mama y útero. A estos compuestos se les llamó SERMS (Selective Estrogen Receptor Modulators) o moduladores selectivos de los receptores de estrógeno. La comprensión de las bases moleculares del funcionamiento de los receptores esteroideos, en este caso del receptor de estrógeno, fue lo que permitió el desarrollo de este concepto. Desafortunadamente no se ha encontrado el SERM ideal, pero algunos están siendo utilizados actualmente para el tratamiento de distintas enfermedades como el cáncer de mama y la osteoporosis.

Tamoxifeno es utilizado actualmente como tratamiento hormonal del cáncer de mama, es el SERM mas conocido y estudiado. Fue descubierto hace 40 años en un momento en que no se conocía la posibilidad que algún químico o droga podía tener una función estrogénica en un tejido y antiestrogénica en otro. El concepto de SERM no existía ya que las bases moleculares de acción de los receptores esteroideos o de este tipo de drogas todavía no habían sido definidas.

El tamoxifeno, al igual que la mayoría de los SERMs, ejerce su acción primariamente al competir con el estradiol en la unión al RE y alterar su conformación (Figura 7). *In vitro*, causa estancamiento de células de cáncer de mama que expresan RE, en la fase G1 del ciclo celular (42) y disminuye las concentraciones de ciclina D1 (43). También, disminuye la expresión del factor transformador de crecimiento alfa (TGF-a) y aumenta la expresión de TGF-b1 y TGF-b2 (44). En la línea celular de cáncer de mama MCF-7, el tamoxifeno inhibe la fosforilación del receptor del factor de crecimiento semejante a la insulina (Insuline-like growth factor receptor) IGF-I (45), pero en una línea celular endometrial (Ishikawa) produce el efecto contrario, es decir, induce la fosforilación del receptor, actuando de manera similar al estrógeno (46). *In vivo*, inhibe el crecimiento de tumores de células MCF-7 implantados en ratones y previene el desarrollo de tumores mamarios en los modelos de ratones NMU y DMBA (47,48). Similar al estradiol, en el

útero, estimula la síntesis de IGF-I y del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) (49,50).



El uso clínico del tamoxifeno ha demostrado ser efectivo en el tratamiento de tumores de mama que expresan RE (aproximadamente el 60-70% de los tumores al momento del diagnóstico) y si es tomada durante 5 años consecutivos previene la aparición de recurrencia del cáncer en un 42% (51). Además esta droga fue aprobada recientemente para la prevención primaria de la aparición de cáncer de mama. Estudios clínicos demostraron que 20 mg de tamoxifeno diarios reducen en un 49% a 55% la incidencia de cáncer de mama.

Entre los efectos secundarios del tamoxifeno al que mayor importancia se le ha dado es al aumento en la incidencia de cáncer endometrial, debido al efecto agonista, tipo estrógeno que tiene el tamoxifeno en el útero (52). Otros efectos son los "calorones", pólipos endometriales, quistes, procesos tromboembólicos, etc. A pesar de los efectos secundarios de esta droga, como el riesgo a desarrollar cáncer de útero, la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer (perteneciente a la OMS) recomendó que las mujeres que reciben tamoxifeno no deben parar su tratamiento por este efecto secundario, ya que los beneficios en la sobrevida que esta droga ofrece son mucho mayores al riesgo a desarrollar cáncer de endometrio. Por esta razón, esta droga ha sido utilizada exitosamente por más de 20 años en el tratamiento del cáncer de mama, y aunque ha existido la preocupación de diseñar otras drogas mucho más selectivas sin estos efectos negativos, hasta el momento no se ha aprobado ninguna que pueda sustituirla.

Raloxifeno esta droga comenzó a ser estudiada cuando se descubrieron los efectos no deseados del tamoxifeno, surgió la necesidad de utilizar otros moduladores selectivos que no tuvieran estos efectos negativos. El raloxifeno fue aprobado hace unos pocos años para el tratamiento de la osteoporosis por el efecto que ejerce en el mantenimiento de la densidad ósea en mujeres posmenopáusicas. Esta droga también tiene efecto antiestrogénico en la mama, pero sin el

efecto estrogénico sobre el útero. Así como el tamoxifeno, disminuye la síntesis de LDL, sin afectar la de HDL y no tiene efectos negativos sobre la memoria.

Entre otros SERMs que se encuentran en proceso de estudio molecular y clínico están el Toremifeno, Droloxifeno, Idoxifeno, Droloxifeno, ICI 182,780, LY353381, GW5638, etc. En algunos años nos encontraremos con la difícil tarea de comparar todos estos compuestos para determinar cuales son mas específicos y con menos efectos secundarios de acuerdo a la enfermedad a tratar.

CONCLUSIONES

Los estrógenos juegan un rol central en la fisiología del organismo. El modelo clásico o "genómico" de acción del RE sugiere que el receptor al unir la hormona es capaz de activar la transcripción de genes que participan en el control del crecimiento y proliferación celular. Dos receptores de estrógeno que cumplen esta función han sido identificados, el RE-a y el RE-b, en conjunto con una serie de proteínas activadoras y represoras. Además, efectos rápidos mediados por esteroides, que estimulan señales intracelulares han sido descritos. Estos efectos "no genómicos" son mediados por receptores de membrana, sin embargo la identidad de estos receptores no ha sido descrita aún. La coexistencia de receptores nucleares y de membrana, es común en diversos tipos celulares y muy probablemente estas dos vías de señalización convergen para ejercer el control de distintos procesos celulares. La comprensión actual de la fisiología compleja del RE y el rol que cumple en distintas enfermedades lo convierte una herramienta farmacológica invaluable. Estos resultados han hecho que las opciones terapéuticas que repercuten en la obtención de una mejor salud para la mujer hayan evolucionado dramáticamente en los últimos 30 años. El conocimiento detallado del RE desde el punto de vista de su estructura, subtipos, distribución e interacción con otras proteínas que determinan su función, va a permitir el desarrollo de nuevos SERMs que puedan tener el efecto deseado en un tejido determinado y con pocos o ningún efecto secundario. En un futuro no muy lejano, muy probablemente la paciente y su médico tendrán a su alcance la posibilidad de elegir el compuesto mas adecuado para tratar y prevenir una o varias enfermedades sin tener que sufrir las consecuencias o riesgos de efectos no deseados.

BIBLIOGRAFÍA

1. Korach, K. S. (1994) Science 266(5190), 1524-7.
2. Barrett-Connor, E. (1997) Circulation 95(1), 252-64.
3. Silbiger, S. R., and Neugarten, J. (1995) Am J Kidney Dis 25(4), 515-33.
4. Mendelsohn, M. E., and Karas, R. H. (1999) N Engl J Med 340(23), 1801-11.
5. Stewart, J. H. (1994) Am J Kidney Dis 24(2), 181-3.
6. Paganini-Hill, A., and Henderson, V. W. (1994) Am J Epidemiol 140(3), 256-61.
7. Evans, R. M. (1988) Science 240(4854), 889-95
8. Jensen, A., and Jacobson, H. (1962) Recent. Prog. Horm. Res. 18, 387-414
9. Toft, D., and Gorski, J. (1966) Proc Natl Acad Sci U S A 55(6), 1574-81.
10. Kuiper, G. G., Enmark, E., Pelto-Huikko, M., Nilsson, S., and Gustafsson, J. A. (1996) Proc Natl Acad Sci U S A 93(12), 5925-30.

11. Ignar-Trowbridge, D. M., Nelson, K. G., Bidwell, M. C., Curtis, S. W., Washburn, T. F., McLachlan, J. A., and Korach, K. S. (1992) *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(10), 4658-62
12. Kato, S., Endoh, H., Masuhiro, Y., Kitamoto, T., Uchiyama, S., Sasaki, H., Masushige, S., Gotoh, Y., Nishida, E., Kawashima, H., and et al. (1995) *Science* 270(5241), 1491-4
13. Pietras, R. J., Arboleda, J., Reese, D. M., Wongvipat, N., Pegram, M. D., Ramos, L., Gorman, C. M., Parker, M. G., Sliwkowski, M. X., and Slamon, D. J. (1995) *Oncogene* 10(12), 2435-46
14. Freedman, L. P. (1992) *Endocr Rev* 13(2), 129-45.
15. Beato, M., Chavez, S., and Truss, M. (1996) *Steroids* 61(4), 240-51.
16. Falkenstein, E., Tillmann, H. C., Christ, M., Feuring, M., and Wehling, M. (2000) *Pharmacol Rev* 52(4), 513-56.
17. Klein-Hitpass, L., Schorpp, M., Wagner, U., and Ryffel, G. U. (1986) *Cell* 46(7), 1053-61
18. Lieberman, B. A. (1997) *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 7(1-2), 43-59
19. Nemere, I., and Farach-Carson, M. C. (1998) *Biochem Biophys Res Commun* 248(3), 443-9
20. Pietras, R. J., Nemere, I., and Szego, C. M. (2001) *Endocrine* 14(3), 417-27.
21. Levin, E. R. (1999) *Trends Endocrinol Metab* 10(9), 374-377
22. Kelly, M. J., and Levin, E. R. (2001) *Trends Endocrinol Metab* 12(4), 152-6.
23. Watson, C. S., and Gametchu, B. (1999) *Proc Soc Exp Biol Med* 220(1), 9-19
24. Szego, C. M., and Davis, J. S. (1967) *Proc Natl Acad Sci U S A* 58(4), 1711-8.
25. Pietras, R. J., and Szego, C. M. (1977) *Nature* 265(5589), 69-72
26. Pietras, R. J., and Szego, C. M. (1980) *Biochem J* 191(3), 743-60
27. Pietras, R. J., and Szego, C. M. (1979) *J Steroid Biochem* 11(4), 1471-83
28. Marquez DC, and RJ., P. (2001) *Oncogene* 20(39), 5420-30
29. Berthois, Y., Pourreau-Schneider, N., Gandilhon, P., Mittre, H., Tubiana, N., and Martin, P. M. (1986) *J Steroid Biochem* 25(6), 963-72
30. Russell, K. S., Haynes, M. P., Sinha, D., Clerisme, E., and Bender, J. R. (2000) *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(11), 5930-5
31. Razandi, M., Pedram, A., Greene, G. L., and Levin, E. R. (1999) *Mol Endocrinol* 13(2), 307-19
32. Pietras, R. J., and Szego, C. M. (1984) *Biochem Biophys Res Commun* 123(1), 84-91
33. Stefano, G. B., Prevot, V., Beauvillain, J. C., Fimiani, C., Welters, I., Cadet, P., Breton, C., Pestel, J., Salzet, M., and Bilfinger, T. V. (1999) *J Immunol* 163(7), 3758-63.
34. Chen, Z., Yuhanna, I. S., Galcheva-Gargova, Z., Karas, R. H., Mendelsohn, M. E., and Shaul, P. W. (1999) *Journal of Clinical Investigation* 103(3), 401-6
35. Stefano, G. B., Prevot, V., Beauvillain, J. C., Cadet, P., Fimiani, C., Welters, I., Fricchione, G. L., Breton, C., Lassalle, P., Salzet, M., and Bilfinger, T. V. (2000) *Circulation* 101(13), 1594-7
36. Farhat MY, Abi-Younes S, Dingaan B, Vargas R, and PW, R. (1996) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 276(2), 652-657
37. Aronica, S. M., Kraus, W. L., and Katzenellenbogen, B. S. (1994) *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(18), 8517-21
38. Nakajima, T., Kitazawa, T., Hamada, E., Hazama, H., Omata, M., and Kurachi, Y. (1995) *Eur. J. Pharmacol.* 294, 625-635
39. Endoh, H., Sasaki, H., Maruyama, K., Takeyama, K., Waga, I., Shimizu, T., Kato, S., and Kawashima, H. (1997) *Biochem Biophys Res Commun* 235(1), 99-102
40. Simpkins, J. W., Rajakumar, G., Zhang, Y. Q., Simpkins, C. E., Greenwald, D., Yu, C. J., Bodor, N., and Day, A. L. (1997) *J Neurosurg* 87(5), 724-30.
41. Zyzek, E., Dufy-Barbe, L., Dufy, B., and Vincent, J. D. (1981) *Biochem Biophys Res Commun* 102(4), 1151-7

42. Sutherland, R. L., Hall, R. E., and Taylor, I. W. (1983) *Cancer Res* 43(9), 3998-4006.
43. Watts, C. K., Sweeney, K. J., Warlters, A., Musgrove, E. A., and Sutherland, R. L. (1994) *Breast Cancer Res Treat* 31(1), 95-105
44. Salomon, D. S., Ciardiello, F., Valverius, E., Saeki, T., and Kim, N. (1989) *Biomed Pharmacother* 43(9), 661-7
45. Guvakova, M. A., and Surmacz, E. (1997) *Cancer Res* 57(13), 2606-10.
46. Kleinman, D., Karas, M., Danilenko, M., Arbell, A., Roberts, C. T., LeRoith, D., Levy, J., and Sharoni, Y. (1996) *Endocrinology* 137(3), 1089-95.
47. Jordan, V. C. (1976) *Eur J Cancer* 12(6), 419-24.
48. Gottardis, M. M., and Jordan, V. C. (1987) *Cancer Res* 47(15), 4020-4.
49. Huynh, H. T., and Pollak, M. (1993) *Cancer Res* 53(23), 5585-8.
50. Hyder, S. M., Stancel, G. M., Chiappetta, C., Murthy, L., Boettger-Tong, H. L., and Makela, S. (1996) *Cancer Res* 56(17), 3954-60.
(1998) *Lancet* 351, 1451-1467
51. Fisher, B., Dignam, J., Wolmark, N., Wickerham, D. L., Fisher, E. R., Mamounas, E., Smith, R., Begovic, M., Dimitrov, N. V., Margolese, R. G., Kardinal, C. G., Kavanah, M. T., Fehrenbacher, L., and Oishi, R. H. (1999) *Lancet* 353(9169), 1993-2000.