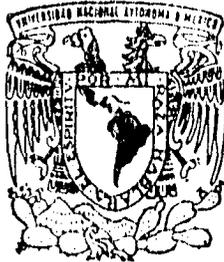


00562

1
25



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

EXPRESION DEL GEN SUPRESOR DE TUMORES p53
Y DE LOS PROTO-ONCOGENES *c-fos* Y *c-jun* EN UTERO
DE RATA DURANTE EL CICLO ESTRAL.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS QUIMICAS
(B I O Q U I M I C A)
P R E S E N T A :
CARMEN ADRIANA MENDOZA RODRIGUEZ

DIRECTOR DE TESIS: DR. MARCO ANTONIO CERRON CERVANTES



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1996

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Endocrinología Molecular del Departamento de Biología de la Facultad de Química de la UNAM, bajo la dirección del Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco de manera muy especial al Dr. Marco Antonio Cerbón por su gran valor humano, por ser un dedicado maestro, y un buen amigo que siempre ha estado al pendiente de mis necesidades, tanto en la realización de este trabajo como personales. Gracias por tenerme la confianza para incursionar en esta nueva área del laboratorio.

Al Dr. Ignacio Camacho, por las Nmil veces que me has ayudado.

A todos los compañeros del Labo.: Juanita, Christian, Ana, Rocío G., Sara, Gaby, Andrea, Sumiko, Francis, Rocío A. y Elsa por su amistad, compañía y ayuda que permitieron que este trabajo llegara a su fin.

Al CONACYT por la beca otorgada para realizar los estudios de maestría.

Al Dr. Roberto Domínguez Casalá, Dra. María Esther Morales y Paola Arteaga por proporcionar los animales utilizados en este trabajo.

A los miembros del Comité Tutorial, Dr. Fernando Montiel, Dr. Marco Cerbón y Dr. Ignacio Camacho, por sus acertados comentarios que ayudaron a mejorar este proyecto.

A los miembros del jurado por su tiempo y dedicación en la revisión de la tesis: Dra. Estela Sánchez Jiménez, Dr. Enrique Piña Garza, Dr. Alejandro García Carrancá, Dr. Roberto Coria Ortega y Dr. Ignacio Camacho Arroyo.

Al Dr. Patricio Gariglio y Dra. Ivonne Castro por proporcionarnos la sonda pSVp53 y RSVcjun, respectivamente.

A Dios, por todos los regalos que me ha dado.

*A mis padres, por enseñarme lo que ningún profesor o libro me puede enseñar: por enseñarme los valores fundamentales sobre los cuales construyo mi vida.
Gracias.*

A Juan Carlos, la razón de mi vida. Gracias por tu apoyo incondicional y tu amor infinito.

*A mis hermanos, por quererme como solo los hermanos
saben querer.*

*A la Familia Medina Frias, por acogirme siempre
con los brazos abiertos.*

*A mi nueva hermana, esperando poder conocernos
mejor.*

*A mis amigos, Jessica, Fernando, Samuel, Eimeen,
Mariana, Laura, Guadalupe, Martha Elena,
Verónica, Angeles, Imelda, Pilar, Luis Héctor,
Raúl, Andrés, Fernando y Marichui por todos los
buenos momentos que hemos compartido juntos.*

INDICE

ABREVIATURAS	4
RESUMEN	6
INTRODUCCIÓN	8
ANTECEDENTES	11
3.1 CICLO ESTRAL DE LA RATA.	12
3.2 HORMONAS ESTEROIDES.	18
3 .2.1 ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LOS RECEPTORES A HORMONAS ESTEROIDES.	18
3 .2.2 MECANISMO GENERAL DE LA REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA POR HORMONAS ESTEROIDES.	23
3.3 C-FOS Y C-JUN.	28
3 .3.1 GENERALIDADES.	28
3 .3.2 ESTRUCTURA.	29
3 .3.3 FUNCIÓN DE AP-1 EN LA PROLIFERACIÓN Y DIFERENCIACIÓN CELULAR.	31
3 .3.4 REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE C-FOS Y C-JUN.	33
3 .3.5 REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE PROTO-ONCOGENES POR HORMONAS ESTEROIDES.	35
3.4 P53	39
3 .4.1 ESTRUCTURA PRIMARIA DE P53.	39
3 .4.2 FUNCIÓN MOLECULAR DE P53.	40
3 .4.3 REGULACIÓN DE LA FUNCIÓN DE P53.	43
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	45

OBJETIVOS	47
5.1 OBJETIVOS GENERALES.	48
5.2 OBJETIVOS PARTICULARES.	48
HIPÓTESIS DE TRABAJO	49
MATERIALES Y MÉTODOS	51
7.1 SOLUCIONES	52
7.2 MÉTODOS	58
7.2.1 TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS COMPETENTES.	58
7.2.2 AMPLIFICACIÓN DE LOS PLÁSMIDOS.	59
7.2.3 DIGESTIÓN ENZIMÁTICA DE LOS PLÁSMIDOS.	60
7.2.4 PURIFICACIÓN DEL CDNA.	62
7.2.5 OBTENCIÓN DE LAS SONDAS.	63
7.2.6 ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.	67
7.2.7 EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL.	68
7.2.8 ELECTROFORESIS DEL RNA.	69
7.2.9 SÍNTESIS DE OLIGONUCLEÓTIDOS.	70
7.2.10 RETROTRANSCRIPCIÓN DEL RNA (RT)	71
7.2.11 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).	71
7.2.12 ELECTROFORESIS DE LOS PRODUCTOS DE RT-PCR	72
7.2.13 TRANSFERENCIA A FILTROS DE NYLON.	73
7.2.14 HIBRIDACIÓN SOUTHERN BLOT	74
7.2.15 ANÁLISIS DENSITOMÉTRICO.	77
7.2.16 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.	78
RESULTADOS	79
8.1 INDUCCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE <i>c-FOS</i> , <i>c-JUN</i> Y P35 POR 17 β -ESTRADIOL EN EL ÚTERO DE RATAS OVARIECTOMIZADAS.	80
8.2 VARIACIONES EN LA EXPRESIÓN DE <i>c-FOS</i> , <i>c-JUN</i> Y P53 EN EL ÚTERO DE LA RATA DURANTE EL CICLO ESTRAL.	87

DISCUSIÓN **93**

CONCLUSIONES **101**

REFERENCIAS **103**

ABREVIATURAS

AP-1	Proteína activadora 1.
AR	Receptor de andrógenos.
Cp	Ciclofilina.
CRE	Elemento de respuesta dependiente de cAMP.
CREB	Proteína que se une al elemento de respuesta dependiente de cAMP
DBD	Dominio de unión al DNA.
DSE	Elemento de simetría doble.
E ₂	Estradiol.
EGF	Factor de crecimiento epidérmico.
ER	Receptor de estrógenos.
ERE	Elemento de respuesta a estrógenos.
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos.
GnRH	Hormona liberadora de gonadotropinas.
GR	Receptor de glucocorticoides.
GRE	Elemento de respuesta a glucocorticoides.
HBD	Dominio de unión a la hormona.
HOB	Caja homóloga.
HPV	Virus del papiloma humano.
HRE	Elemento de respuesta hormonal.
HSP	Proteína de choque térmico.
IL	Interleucina.
LH	Hormona luteinizante.
MR	Receptor de mineralocorticoides.
NGF	Factor de crecimiento nervioso.
P ₄	Progesterona.
Pb	Pares de bases.

PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas.
PR	Receptor de progesterona.
RAR	Receptor de ácido retinoico.
RT-PCR	Reacción de la transcriptasa reversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa.
SP1	Proteína específica 1.
SR	Receptores a hormonas esteroides.
SRE	Elemento de respuesta a suero.
SRF	Factor de respuesta a suero.
SV40	Virus de simio 40.
TAF	Funcion activadora de la transcripción.
TBP	Proteína que se une a la caja TATA.
TGF	Factor de crecimiento tumoral
THRE	Elemento de respuesta a hormonas tiroideas.
TPA	12-o-tetradecanoil-forbol-13-acetato.
TRE	Elemento de respuesta a TPA.
V	Vehículo (90 % solución salina, 10 % etanol)

RESUMEN

En este trabajo se estudió la regulación de la expresión de los genes *c-fos*, *c-jun* y p53 en el útero de ratas ovariectomizadas tratadas con 17 β -estradiol y en el útero de animales intactos en las diferentes etapas del ciclo estral. Para ello se usó la técnica de retrotranscripción acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR). En las ratas ovariectomizadas se incrementó la expresión de los genes de *c-fos*, *c-jun* y p53 una hora después de la administración del estradiol. Este resultado sugiere que p53 podría ser incluido en los genes que son activados tempranamente por estrógenos. Durante el ciclo estral la máxima expresión del gen de *c-fos* se encontró en la mañana tanto del día del proestro como del estro. La máxima expresión del gen de p53 se observó durante el metaestro, mientras que la mínima se detectó en los días del proestro y estro (cuando *c-fos* alcanzó su máximo nivel). En contraste con *c-fos* y p53, la expresión de *c-jun* se mantuvo prácticamente constante durante el ciclo estral. Los diferentes patrones de expresión observados de los diversos genes estudiados durante el ciclo estral indican que p53, *c-fos* y *c-jun* están bajo regulación multi-hormonal. Los resultados indican que *c-fos*, *c-jun* y p53 son genes inducidos tempranamente por estrógenos, y que pueden así participar en la subsecuente activación o represión de genes específicos involucrados en la función normal del útero.

INTRODUCCIÓN

Uno de los principales efectos de los estrógenos sobre el útero y las glándulas mamarias en los mamíferos es la inducción de la replicación del DNA y la proliferación celular. El mecanismo mediante el cual los estrógenos llevan a cabo esta función es mediante la unión de la hormona a su receptor intranuclear. El complejo hormona-receptor al unirse a secuencias reguladoras o elementos de respuesta hormonal (HRE) actúa como un factor de transcripción, modulando (activando o reprimiendo) la expresión de genes que contiene dicho HRE. Dos clases diferentes de genes son regulados por las hormonas esteroideas: los genes tempranos y los genes tardíos. Los genes que responden tempranamente a las hormonas esteroideas incluyen genes reguladores importantes, tales como factores de transcripción. Las proteínas de los genes tempranos dotan a la célula con nuevas propiedades e inician una cadena de sucesos secundarios (la expresión de los genes tardíos), los cuales llevan finalmente a los cambios complejos típicos de la acción hormonal, como por ejemplo la replicación celular.

En el útero de ratas ovariectomizadas se ha observado que algunos de los genes que son inducidos tempranamente por estradiol pertenecen a la familia de los proto-oncogenes nucleares, entre los cuales se encuentran *c-fos*, *c-jun*, *jun-B*, *jun-D*, *c-myc* y *N-myc*. Más aún, los productos proteicos de estos proto-oncogenes tienen dominios de unión al DNA y de transactivación, lo cual les permite actuar como factores de transcripción. Sin embargo, no se ha estudiado el efecto que tiene el estradiol sobre otro tipo de genes que están íntimamente relacionados con los proto-oncogenes, los genes supresores de tumores. Algunos de los genes de esta familia actúan como factores de transcripción y regulan la expresión de proto-oncogenes, como es el caso de p53 el cual inhibe la expresión de *c-fos* y *c-jun* en fibroblastos embrionarios de rata. Así mismo, no se ha determinado si la expresión de estos genes es regulada en condiciones fisiológicas por estrógenos.

Durante el ciclo estral de la rata se presentan variaciones importantes en los niveles de estradiol y progesterona, lo cual lo hace un modelo adecuado para que en

condiciones fisiológicas se pueda evaluar el papel de estas hormonas esteroides en la regulación de la expresión de diferentes genes.

Tomando en cuenta la importancia de los proto-oncogenes en la proliferación inducida por estrógenos, en este trabajo se propuso determinar el patrón de expresión de los proto-oncogenes *c-fos* y *c-jun* y del gen supresor de tumores p53, en el útero de ratas intactas, durante las diferentes fases del ciclo estral y compararlo con la expresión de estos genes en el útero de ratas ovariectomizadas tratadas con dosis farmacológicas de 17 β -estradiol. Para medir la expresión de los genes en estudio se extrajo el RNA del útero de ratas, tanto ovariectomizadas tratadas con estradiol como de ratas en las diferentes fases del ciclo estral, y se amplificó por medio de la técnica de la Transcriptasa Reversa acoplada a la Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR), y posteriormente se cuantificó por medio de Southern Blot.

ANTECEDENTES

3.1 CICLO ESTRAL DE LA RATA.

La rata es un mamífero de ovulación espontánea, esto es, la ovulación no depende de una estimulación externa como en el caso del conejo, en el cual es necesario la cópula para que se presente la ovulación. Así mismo, las ratas ovulan durante todo el año y su ciclo estral está constituido por cuatro etapas: proestro, estro, metaestro (también llamado diestro temprano) y diestro. Las ratas presentan ciclos de cuatro a cinco días de duración. En ratas que presentan ciclo de cuatro días de duración, los niveles de estradiol en plasma periférico son basales (8 ± 2 pg/ml) durante el estro (Figura 1) (Brown-Grant *et al.*, 1970; Butcher *et al.*, 1974; Freeman, 1988). Los niveles de estradiol en plasma empiezan a aumentar en la tarde del metaestro y durante el diestro hasta llegar a su máximo valor (45 ± 2 pg/ml) a las 9:00 am del proestro (Butcher *et al.*, 1974). Durante la tarde del proestro los niveles de estradiol caen rápidamente y alcanzan valores basales en las primeras horas de la mañana del estro. El estradiol es secretado por los folículos de De Graaf que se encuentran en desarrollo. Los tipos celulares responsables de dicha secreción son las células de la teca interna y las células de la granulosa.

El aumento en la concentración de estrógenos en la sangre desencadena un estímulo neural cíclico que activa la liberación de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) por el hipotálamo. La GnRH a su vez desencadena la secreción de la hormona luteinizante (LH) por la hipófisis. Los niveles circulantes de LH empiezan a incrementarse alrededor de las 2 a 3 p.m. del proestro, y alcanzan su nivel máximo (37 ± 5 ng/ml) entre las 5 y las 7 p.m. esa misma tarde (Figura 1) (Brown-Grant *et al.*, 1970; Butcher *et al.*, 1974; Freeman, 1988).

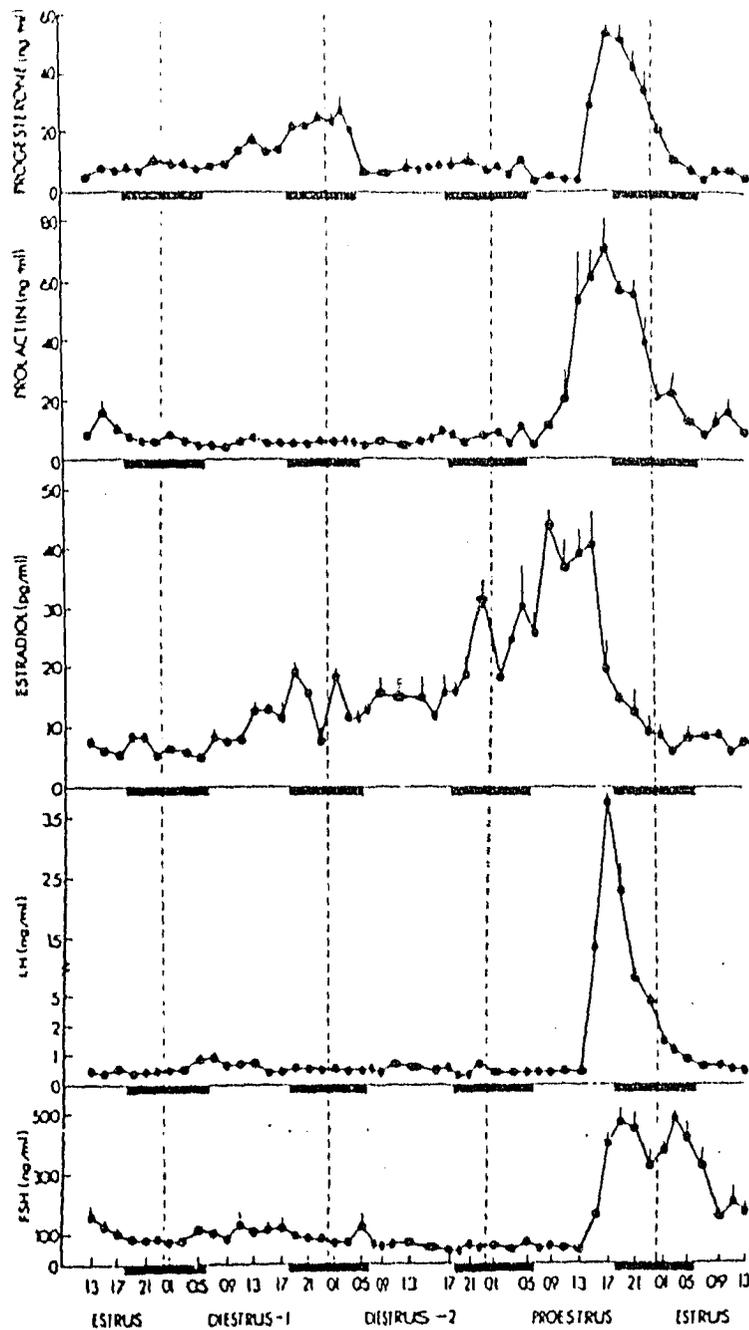


Figura 1. Concentraciones hormonales durante el ciclo estral. Concentración de progesterona, prolactina, estradiol, LH y FSH en plasma periférico obtenido en intervalos de 2 horas a través de los 4 días del ciclo estral de la rata. Las barras negras representan los intervalos de oscuridad en la colonia y los números en la base representan la hora del día (Freeman, 1988).

Este rápido incremento de LH induce la ruptura folicular y la ovulación en las primeras horas del estro. El nivel en sangre de LH empezará a disminuir en la noche del proestro, alcanza niveles basales (0.5 ± 0.15 ng/ml) en las primeras horas de la mañana del estro y permanece así durante el metaestro y el diestro (Brown-Grant *et al.*, 1970; Butcher *et al.*, 1974; Freeman, 1988). El patrón de secreción de la Hormona Folículo Estimulante (FSH) y prolactina durante el ciclo estral es similar al de LH.

Durante el ciclo estral se presentan dos incrementos en los niveles de progesterona secretada en plasma periférico (Figura 1). Durante la tarde del proestro se observa un incremento de progesterona, secretada por las células de la granulosa del folículo preovulatorio, la cual alcanza su valor máximo entre las 6:00 y 9:00 pm (46 ± 7 ng/ml). Este incremento sucede casi simultáneamente al incremento de LH. Los niveles de progesterona vuelven a niveles basales (2 ± 1 ng/ml) para la mañana del estro (Butcher *et al.*, 1974; Freeman, 1988). Un segundo pico, de origen lúteo, se presenta alrededor del mediodía del metaestro (24 ± 3 ng/ml), se prolonga hasta las primeras horas de la mañana del diestro y desciende a niveles basales poco tiempo después del amanecer del diestro.

Pocas horas después del incremento de progesterona en la tarde del proestro se presenta un comportamiento característico de lordosis. Es probable que el aumento de los niveles de estrógenos seguido por el aumento de los niveles de progesterona facilite la lordosis en el estro, ya que este comportamiento no se presenta en ninguna otra etapa del ciclo estral.

El cambio en las concentraciones de hormonas durante el ciclo estral afecta la actividad del oviducto, útero, cervix y vagina, así como también algunos efectos fisiológicos generalizados.

La forma más común como se determina la etapa del ciclo estral en el que se encuentra cada rala, es por medio del estudio de los cambios morfológicos en las

células del epitelio vaginal. En un frotis vaginal pueden presentarse dos o más tipos celulares, pero es el tipo celular predominante el que indica la etapa del ciclo estral en el que se encuentra. Los tres diferentes tipos celulares que se pueden observar en un frotis vaginal de rata son : a) células epiteliales nucleadas ; b) leucocitos polimorfonucleares y c) células epiteliales cornificadas. La pared vaginal durante el estro presenta un aspecto seco, blanco y carente de brillo pero cambia durante el metaestro presentando un aspecto húmedo y rosado. Estos cambios están asociados con la cornificación de las capas superiores durante el estro y con la extensa descamación al final de esta etapa. A medida que se aproxima el proestro los tipos celulares presentes en los fluidos vaginales consiste de células epiteliales nucleadas y leucocitos y ocasionalmente algunas células cornificadas. Durante el proestro, los leucocitos desaparecen, las células epiteliales nucleadas aumentan en número y son gradualmente reemplazadas por células cornificadas sin núcleo. El principio del estro ocurre cuando el frotis presenta 75% de células nucleadas y 25% de células cornificadas. Eventualmente, las células cornificadas son las únicas presentes. El metaestro y el diestro se caracterizan por la aparición de un gran número de leucocitos y la desaparición de las células cornificadas (Baker, 1979).

El útero también presenta cambios cíclicos, dependientes de esteroides, tanto en su estructura como en su función. Durante cada ciclo, el útero inicialmente se prepara para recibir y transportar el espermatozoide del cervix al oviducto, y subsecuentemente se prepara para recibir los embriones del oviducto. El útero esta compuesto por dos capas: miometrio y endometrio. El miometrio es la porción muscular de la pared uterina. Consiste de dos capas de músculo liso: una capa gruesa interna que es circular y una capa más delgada externa que es longitudinal. Entre ambas capas se encuentra una capa de tejido conectivo que contiene nervios, vasos linfáticos y sanguíneos. El endometrio consiste de una matriz o estroma, sobre la cual se asienta un epitelio columnar simple bajo con extensiones glandulares que penetran el estroma (Hafez, 1970).

Durante el proestro, el endometrio está bajo la influencia de los estrógenos producidos por los folículos ováricos (fase folicular), su vascularización se incrementa, el epitelio se convierte en un epitelio columnar bajo y las glándulas presentan cierto crecimiento. La actividad proliferativa del epitelio da lugar a un gran incremento en el área superficial; la proliferación principal es del epitelio luminal. Las células epiteliales secretan un fluido de constitución líquida que contiene algunas proteínas, principalmente enzimas proteolíticas. En esta etapa aumenta la contractibilidad y excitabilidad del endometrio y el tamaño del estroma se incrementa ya que presenta proliferación celular (lo cual da lugar a la expresión de fase proliferativa del ciclo estral) (Hafez, 1970).

Durante el estro y el metaestro (fase lútea) las estructuras del endometrio están controladas por la progesterona producida por el cuerpo lúteo: el endometrio se expande, el epitelio luminal se convierte a uno de tipo columnar alto y las glándulas crecen hasta su máximo tamaño, las glándulas ahora son activamente secretoras; secretan un fluido rico en glicoproteínas, azúcares y aminoácidos. Las células del estroma se hacen más largas y más hinchadas. La progesterona actúa sobre el miometrio causando el crecimiento de las células y, en contraste con los estrógenos, disminuye la excitabilidad de la musculatura uterina (Hafez, 1970).

Al final de la fase lútea, durante el diestro, el epitelio secretor se colapsa, el endometrio se reabsorbe y es reemplazado por una pequeña capa de estroma cubierta con tejido epitelial lista para entrar a un nuevo ciclo (Hafez, 1970).

La proliferación de cada uno de estos tejidos durante el ciclo estral ha sido determinada por medio de la medición de la actividad mitótica uterina. La actividad mitótica en el epitelio luminal es máxima durante la noche del diestro y la mañana del proestro, desciende rápidamente después y presenta una elevación secundaria durante el metaestro. El epitelio glandular solamente prolifera durante el metaestro. En el estroma endometrial, la mitosis ocurre en la tarde del diestro y la mañana del proestro y

en el miometrio, la máxima proliferación ocurre durante el proestro, pero es menos intensa que en el epitelio luminal (Tabla 1) (Marcus, 1974; Bertalanffy y Lau, 1963).

TABLA 1. Actividad mitótica uterina durante el ciclo estral (Marcus, 1974)

Tiempo	Mitosis / Sección				
	Epitelio				
	Lumen	Glándulas	Estroma	Miometrio	
Proestro	a.m.	40.4 ± 4.1	3.2 ± 1.4	19.0 ± 4.9	16.6 ± 3.2
	p.m.	15.3 ± 3.0	1.7 ± 0.5	3.2 ± 0.9	12.2 ± 2.4
Estro	a.m.	3.2 ± 1.4	0.4 ± 0.2	1.2 ± 0.4	5.6 ± 3.2
	p.m.	0.2 ± 0.2	0.2 ± 0.2	0.8 ± 0.4	1.6 ± 0.9
Metaestro	a.m.	18.0 ± 2.4	15.0 ± 4.0	0.8 ± 0.4	0
	p.m.	11.6 ± 2.1	20.2 ± 3.0	1.8 ± 0.3	0
Diestro	a.m.	8.5 ± 1.7	1.7 ± 0.9	2.2 ± 0.6	0
	p.m.	35.4 ± 3.5	1.6 ± 0.7	35.6 ± 5.3	1.0 ± 0.6

Este comportamiento no se observa ni en las ratas inmaduras ni en las ratas adultas ovariectomizadas tratadas con estradiol. En las ratas inmaduras una sola dosis de estrógenos (50 ng/rata) induce la proliferación en todos los tejidos uterinos: epitelio, estroma y miometrio (Quarmby y Korack, 1984; Kirkland *et al.*, 1979; Kaye *et al.*, 1972). El índice mitótico en el epitelio luminal alcanza su máximo valor 24 horas después del tratamiento (Kirkland *et al.*, 1979; Kaye *et al.*, 1972). En el estroma y miometrio el máximo índice mitótico se observa entre las 24 horas (Kaye *et al.*, 1972) y 36-48 horas (Kirkland *et al.*, 1979). El útero de la rata adulta no responde de la misma manera a los estrógenos, ya que la mitosis en el estroma de ratas ovariectomizadas solamente se presenta si la rata ha sido pretratada con progesterona (P₄). Las ratas adultas ovariectomizadas que han sido tratadas con 17β-estradiol (0.2 µg/rata) solo presentan mitosis en los epitelios luminal y glandular, pero no en el estroma. En el epitelio luminal el índice mitótico empieza a aumentar 12 h después del tratamiento con 17β-estradiol

(E₂), alcanza su máximo valor a las 24 h y regresa a niveles basales a las 36 h. En el epitelio glandular el índice mitótico empieza a aumentar a las 12 h y presenta el máximo valor a las 48 h, regresando a los niveles basales 72 h después del tratamiento con E₂ (Tachi *et al.*, 1972). El pretratamiento con P₄ suprime la acción mitogénica del E₂ tanto en el epitelio luminal como glandular y causa una respuesta mitótica en el estroma en respuesta al E₂. El estroma comienza a proliferar 12 h después del tratamiento con P₄ (5 mg diarios por 1 a 7 días) + E₂ (0.2 µg/rata), se presenta el máximo índice mitótico a las 24 h y regresa a niveles basales a las 36 h. Las células del estroma que presentan mitosis se ubican principalmente en la región que se encuentra debajo del epitelio luminal. La P₄ sola no produce mitosis en ninguno de los tejidos (Clark, 1971; Tachi *et al.*, 1972).

Ya que la proliferación ocurre en todos los tejidos del útero durante el ciclo estral, se debe pensar que la cantidad de P₄ producida durante el metaestro-diestro en la rata tiene un significado fisiológico importante en lo que respecta a la proliferación del miometrio y el estroma.

3.2 HORMONAS ESTEROIDES.

3.2.1 Estructura y función de los receptores a hormonas esteroides.

Los receptores nucleares regulan la transcripción de complejas redes de genes y por lo tanto controlan diversos aspectos del crecimiento, desarrollo y homeostasis. La superfamilia de receptores nucleares incluye receptores intracelulares para las hormonas esteroides, hormona tiroideas, ácido retinoico, vitamina D, así como una gran variedad de proteínas de las cuales se desconoce su ligando, los llamados receptores huérfanos (Fuller PJ, 1991).

Se han realizado extensos estudios estructurales y funcionales de los receptores a hormonas esteroides (SRs Steroid Receptors) con el objetivo de entender cómo regulan la actividad transcripcional de genes específicos. Todos los miembros de la familia de receptores a hormonas esteroides comparten características estructurales y funcionales similares en lo que respecta a la regulación de la transcripción de diferentes genes. Todos los receptores en esta familia tienen tres dominios estructurales altamente conservados (Figura 2). Uno de estos es un dominio altamente conservado de 66-68 aminoácidos, el cual está localizado en la parte central de la proteína. Funcionalmente esta región contiene el dominio de unión al DNA (DBD DNA Binding Domain). Las otras dos secuencias son de 42 y 34 aminoácidos y están localizadas hacia el extremo C-terminal respecto al DBD. Estas dos secuencias están mezcladas con secuencias no conservadas, tienen un menor grado de homología que el DBD y son ricas en aminoácidos hidrofóbicos. Funcionalmente, estas secuencias contribuyen a la formación de la bolsa hidrofóbica para la hormona, mientras que las secuencias no conservadas están involucradas en la unión de la hormona específica. Adicionalmente, la región C-terminal de la proteína tiene por lo menos otras tres funciones: contribuye en la función transactivadora del receptor, en la localización nuclear y en la formación de homodímeros (Fuller PJ, 1991).

Los receptores contienen un dominio variable o A/B, localizado en el extremo N-terminal de la proteína del receptor. Este dominio varía tanto en tamaño como en secuencia (Figura 2) y está involucrado en la regulación de la transcripción génica tejido y promotor-específico (Berry *et al.*, 1990), y en la formación de homodímeros y heterodímeros con otros factores de transcripción (Landers y Spelsberg, 1992).

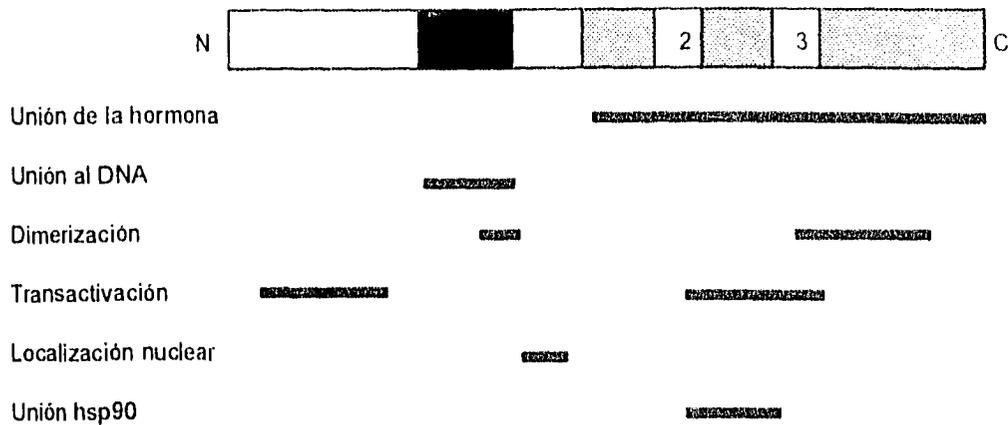


Figura 2. Representación esquemática de un receptor a hormonas esteroides indicando su organización estructural y funcional. La porción central negra es el dominio de unión al DNA (DBD) de 66-68 aminoácidos que define a esta superfamilia. Las regiones sombreadas en el extremo carboxi terminal es el dominio de unión a la hormona (HBD), la cual incluye los dominios conservados 2 y 3 (Fuller, 1991).

El dominio de unión al DNA (DBD) es la región más altamente conservada entre los miembros de la familia de receptores a hormonas esteroides. Este dominio contiene dos iones de zinc coordinados tetraédricamente con 8 residuos de cisteína. La coordinación del zinc es importante para la integridad estructural y la función de unión al DNA del DBD. Este dominio tiene dos subdominios (CI y CII) que son codificados por dos exones separados. Cada uno de ellos está compuesto del motivo lazo-hélice y cada uno tiene un ion zinc ligado por dos cisteínas ubicadas en el inicio del lazo y por dos cisteínas ubicadas en el extremo N-terminal de la α -hélice. Las dos hélices se encuentran empacadas una contra la otra en un ángulo casi recto (Harrison, 1991). Los residuos de aminoácidos de estos dos subdominios se pliegan para formar un solo dominio estructural. La estructura de esta región parece ser el motivo hélice-vuelta-hélice, el cual es común para varias proteínas que unen DNA (incluyendo factores de transcripción), y puede unirse al surco mayor del DNA para inducir cambios en la transcripción de genes regulados por esteroides. Se cree que los aminoácidos que se encuentran entre las primeras dos cisteínas del segundo dedo de zinc forman una

región de dimerización (Trus y Beato, 1993). Todo este dominio controla a que elemento del DNA se va a unir el SR y, por lo tanto, que gen será regulado por el receptor. Por lo menos tres aminoácidos del extremo C-terminal del primer dedo de zinc (entre los dos dedos) son críticos para que el receptor reconozca el elemento de respuesta apropiado (Mader *et al.*, 1989).

El dominio de unión al esteroide (HBD Hormone Binding Domain) está localizado en el extremo C-terminal de la proteína. Este dominio es importante en la regulación de la actividad transcripcional del receptor. Subregiones específicas del dominio de unión al esteroide son responsables de conferir actividad transcripcional o "funciones activadoras de la transcripción" (TAF Transcription Activating Factor), las cuales se han identificado en ciertos receptores y son muy similares a los "dominios de activación ácidos" de ciertos factores de transcripción, no relacionados con los SR. La actividad de esta región es dependiente de la unión de ligandos agonistas (Webster *et al.*, 1988). La localización de la región TAF dentro del receptor no ha sido totalmente determinada, ya que ha sido localizada en diferentes regiones del receptor. Otra región de dimerización menos definida se traslapa con el HBD y parece ser dependiente de la unión de la hormona (Fawell *et al.*, 1990). La formación de homodímeros es una característica general de esta familia.

A pesar del conocimiento detallado que se tiene de los diferentes dominios y subdominios de los SR, existe poco consenso del papel mecánico que juegan los esteroides en la función del receptor. En cualquier modelo de acción de hormonas esteroides se da por un hecho que la unión de la hormona al receptor es esencial para activar al receptor a una forma que es capaz de unirse con alta afinidad al DNA y regular la transcripción de genes específicos. Sin embargo, esta simple suposición ha sido cuestionada por estudios *in vitro* usando receptores purificados, los cuales presentan interacciones receptor/DNA en la ausencia del esteroide. Por ejemplo, se ha demostrado que el receptor de glucocorticoides (GR) libre de esteroide no solamente se une selectivamente al elemento de respuesta a esteroide (HRE Hormone Response

Element) del virus del tumor mamario de ratón (MMTV), sino que además se une ligeramente con mayor afinidad que en la presencia de la hormona (Willmann y Beato, 1986). Se han alcanzado conclusiones similares con el receptor de estrógenos (ER) y de progesterona (PR), las cuales indican que la unión al DNA de los SRs no parece ser absolutamente dependiente de la presencia de la hormona (Klein-Hitpass *et al.*, 1989; Lees *et al.*, 1989; Murdoch *et al.*, 1990; Brown y Sharp, 1990). Sin embargo, se debe de ser cauteloso en la interpretación de estos estudios *in vitro* y su relevancia en los sucesos *in vivo*.

Una posible explicación para estas observaciones puede ser que, en preparaciones en crudo, el receptor esté asociado con otros factores que inhiben su interacción con secuencias específicas del DNA y que tanto el tratamiento hormonal como la purificación inducen la liberación de los factores inhibidores. Las proteínas de choque térmico (hsp70 y hsp90) son candidatos ideales para estos factores inhibidores, los cuales están asociados con el SR y se liberan cuando se une la hormona. Esta hipótesis es apoyada por estudios de transcripción *in vitro*, los cuales demuestran que los receptores purificados unidos a la hormona son capaces de aumentar la transcripción de genes que contienen HRE, mientras que los receptores libres de esteroides provenientes de extractos nucleares crudos fallan en activar la función activadora de la transcripción (Bagchi *et al.*, 1990). Una explicación alternativa ha sido propuesta por Schauer *et al.* quienes estudiaron la cinética de la interacción entre el GR y el DNA. Demostraron que los esteroides tienen un efecto importante en la velocidad a la cual el receptor se asocia o disocia del DNA. La unión de la hormona incrementa significativamente la velocidad con la que el receptor se disocia del DNA (aumenta 30 veces comparado con el receptor sin hormona), mientras que la velocidad de asociación es afectada en menor grado (incremento de ~ 5 veces) (Schauer *et al.*, 1989). Beato *et al.* sugirieron que este efecto puede no ser específico para GR, sino que puede ser una propiedad general de los SR ya que se han hecho observaciones similares con PR (Beato *et al.*, 1991). Por lo tanto, el efecto del esteroide puede ser el alterar la cinética de la interacción receptor/DNA.

Originalmente se creía que los SR se localizaban en el citoplasma y que se translocaban al núcleo cuando se unía la hormona (Jensen *et al.*, 1968). Estudios más recientes han demostrado que, a excepción del GR, los SR están asociados al núcleo de la célula, aún en ausencia de la hormona, y que la unión del ligando solamente incrementa la unión del receptor al núcleo (Picard *et al.*, 1990). Todos los SR contienen una secuencia de aminoácidos básicos (lisinas y argininas) en la vecindad del segundo dedo de zinc, entre los dominios de unión al DNA y el de unión al esteroide. Este dominio es llamado la región "hinge" (gancho), cuya secuencia no es altamente conservada. Se ha encontrado que esta región básica es la señal de localización nuclear para varios SR, incluyendo el receptor de mineralocorticoides (MR), andrógenos (AR), GR, PR y ER (Picard y Yamamoto, 1987; Arriza *et al.*, 1987; Green y Chambon, 1991; Trapman *et al.*, 1988; Guiochon-Mantel *et al.*, 1989). También se han identificado señales de localización nuclear en el dominio de unión a la hormona. Picard y Yamamoto han demostrado que la secuencia de localización nuclear ubicada en el dominio de unión a la hormona del GR es dependiente de la hormona y puede tener un significado en la localización citosólica de este receptor no unido a glucocorticoides (Picard y Yamamoto, 1987).

3.2.2 Mecanismo general de la regulación de la expresión génica por hormonas esteroideas.

Para entender como las hormonas esteroideas son capaces de regular las vías involucradas en la proliferación y diferenciación celular, es claro que primero se tiene que entender los mecanismos moleculares por medio de los cuales los esteroideas realizan sus efectos biológicos. Un modelo general para la acción de las hormonas esteroideas se observa en la Figura 3 y es válido para la acción de estrógenos, progesterona, andrógenos y glucocorticoides.

Se piensa que el esteroide libre se difunde pasivamente dentro de todas las células, ya que hasta el momento no se tiene una evidencia sólida para un transporte activo de estas moléculas. Los esteroides son retenidos en las células blanco por medio de la formación de un complejo de alta afinidad con el receptor específico. La unión del esteroide resulta en la "activación" de la molécula del receptor. La activación involucra cambios conformacionales (estructura terciaria) y postraduccionales en el receptor, así como cambios en la asociación entre proteínas (estructura cuaternaria) en el complejo hormona-receptor. Estos cambios en la estructura permiten que el complejo hormona-receptor se una con alta afinidad a secuencias específicas de DNA, los llamados HRE. Estos elementos reguladores son secuencias palindrómicas de DNA de 15-20 pares de bases localizadas en el extremo 5' (o incluso dentro del gen) de genes regulados por hormonas. Se han caracterizado cuatro clases de HRE (Fuller PJ, 1991); el elemento de respuesta a glucocorticoides (GRE) que tiene una secuencia consenso GTACAnnnTGTTCT. Los receptores para andrógenos, progesterona y mineralocorticoides también actúan por medio de este elemento de respuesta. La secuencia consenso del elemento de respuesta a estrógenos (ERE), AGGTCAnnnTGACCT, es muy parecida al elemento de respuesta a hormonas tiroideas (THRE), solamente que esta última no tiene los nucleótidos separadores (TCAGGTCA TGACCTGA). Tanto los homodímeros como los heterodímeros del receptor del ácido retinoico (RAR) se unen al THRE. El receptor huérfano COUP se une a la secuencia GTGTCAA AGGTCA, la cual representa la cuarta clase de elementos de respuesta.

La unión del dímero del SR al HRE regula la transcripción de los genes "reguladores" minutos después de que el esteroide entra en la célula blanco. En esta célula puede haber varios de estos "genes reguladores" que responden a un esteroide en particular. Como se observa en la Figura 3, cada uno de los "genes reguladores" codifica para una proteína reguladora la cual puede alterar la expresión de una gran variedad de genes por medio de varias vías posibles.

Como se observa en la vía # 1 de la Figura 3 algunas proteínas reguladoras podrían tener actividad enzimática en citoplasma/membrana plasmática (p.e. quinasas o proteasas) las cuales a su vez podrían inducir cambios en el transporte de membrana, síntesis proteica, procesamiento o secreción de proteínas. Un ejemplo posible de esta vía ha sido informado por Hagstrom *et al.* Este grupo encontró que los andrógenos regulan la producción de la proteína secretora de vesícula seminal, del cobayo, únicamente al nivel del procesamiento de la proteína (Hagstrom *et al.*, 1989). Los andrógenos regulan la expresión de una enzima elastasa que funciona en el procesamiento de la proteína secretora. Este grupo piensa que la inducción rápida de la expresión del gen de la elastasa (gen regulador) causa la rápida síntesis de la elastasa, la cual modula el procesamiento y secreción de la proteína secretora de vesícula seminal.

Alternativamente, como se observa en la vía # 2 de la Figura 3 la proteína reguladora enzimática puede modificar factores nucleares, los cuales a su vez pueden regular la estructura de la cromatina, la transcripción génica como factores de transcripción, o posiblemente el procesamiento del RNA. Se ha informado la existencia de proteínas reguladas por esteroides involucradas en la vida media del mRNA (Forsthoefel y Thompson, 1987; Fink *et al.*, 1988; Lau *et al.*, 1990). Así mismo, también se ha informado la acción de las hormonas esteroides en la estructura de la cromatina (Hager y Archer, 1991).

Finalmente, como se observa en la vía # 3 de la Figura 3 las proteínas reguladoras pueden ser factores nucleares que directamente regulan la estructura de la cromatina o la transcripción de genes como factores de transcripción. En la Figura 4 se observa como el factor de transcripción se une a un 2º HRE localizado en el extremo 5' o dentro del "gen estructural" regulado por esteroides (gen tardío). Por lo tanto, el HRE que reside cerca o dentro del gen tardío funcionaría como un HRE secundario el cual une factores de transcripción además de (o en lugar de) hormonas esteroides.

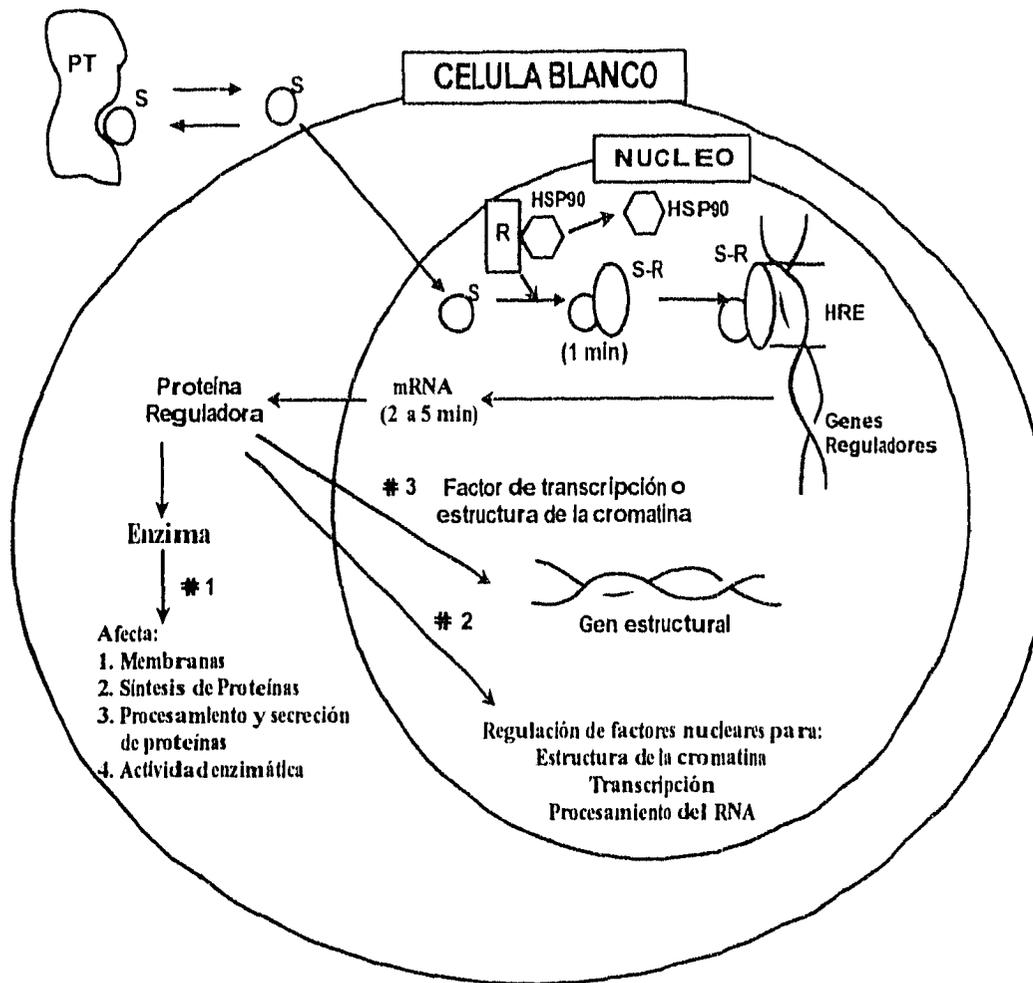


Figura 3. Mecanismo general de acción de las hormonas esteroides. El receptor activado por la hormona esteroide se une a un elemento de respuesta hormonal localizado en el extremo 5' de un gen regulador (también llamado gen temprano o primario). Esta unión regula la transcripción del gen regulador minutos después de que la hormona entra a la célula. Dentro de la célula blanca pueden existir varios genes reguladores que responden a una hormona en particular, y cuya proteína participa en una multitud de sucesos en varios sitios dentro de la célula. El tiempo indicado representa el tiempo estimado para que ocurra el suceso después de la entrada de la hormona a la célula. PT= proteína transportadora, R= receptor, S= esteroide, S-R= receptor activado, HRE= elementos de respuesta a hormonas esteroides, HSP90= proteína de choque térmico (Landers y Spelsberg, 1992).

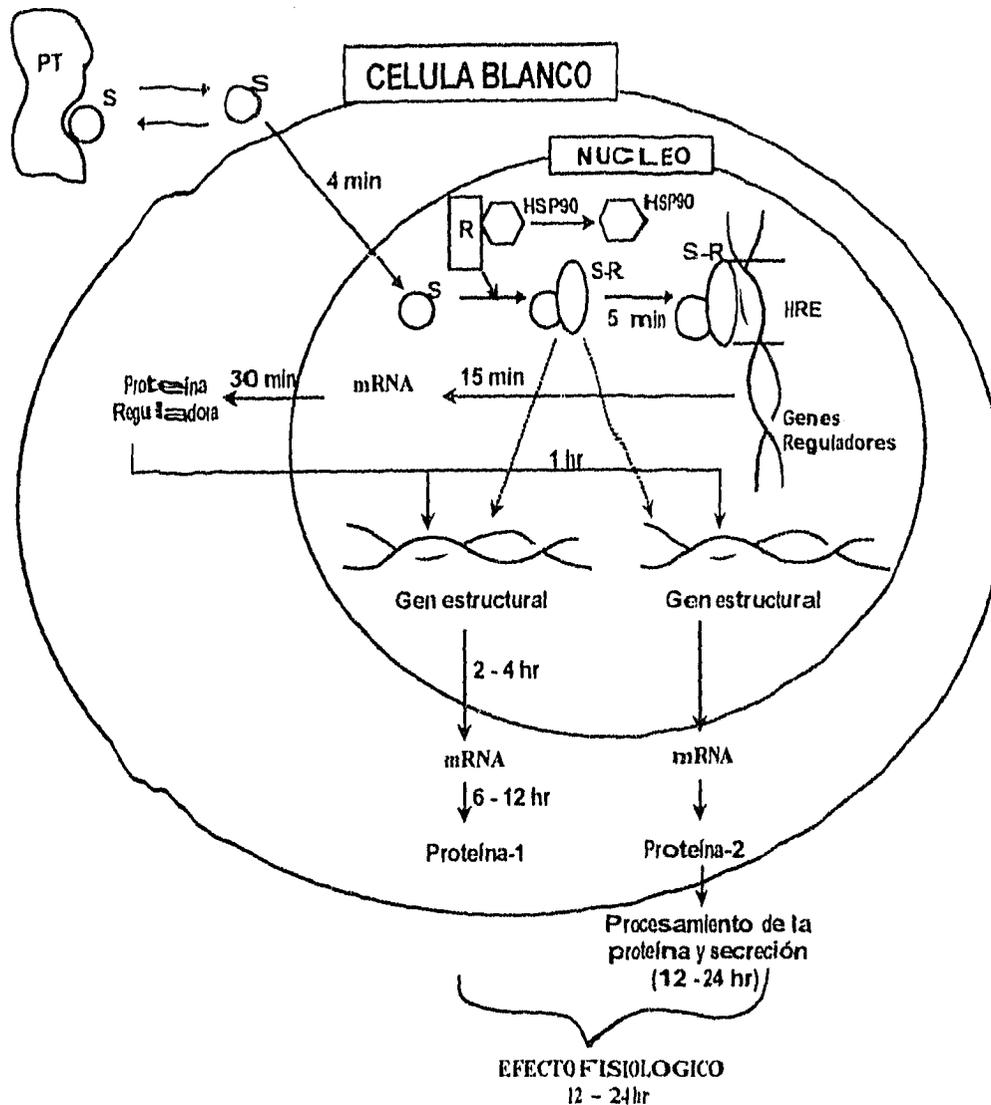


Figura 4. Regulación de la expresión de genes de respuesta secundaria por hormonas esteroides. La interacción del receptor hormonal activado con el elemento de respuesta hormonal de los genes reguladores resulta en la rápida producción de una proteína reguladora. Esta proteína reguladora interactúa con un elemento regulador secundario (de un gen estructural o tardío), el cual puede unir diversos factores de transcripción además del (o en vez del) receptor hormonal. PT= proteína transportadora en suero, R= receptor, S= esteroide, S-R= receptor activado, HRE= elementos de respuesta a hormonas esteroides, HSP90= proteína de choque térmico (Landers y Spelsberg, 1992).

La regulación de la transcripción de los genes estructurales (tardíos) ocurriría 2 a 4 horas después de la entrada del esteroide a la célula (Landers y Spelsberg, 1992).

Por medio de estas tres vías, cada "gen regulador", controlado por hormonas esteroides, puede regular la expresión de una multitud de genes a nivel tanto transcripcional como postranscripcional.

3.3 C-FOS Y C-JUN.

3.3.1 Generalidades.

Los proto-oncogenes *c-fos* y *c-jun* originalmente fueron descritos como los homólogos celulares de los oncogenes presentes en el retrovirus murino FBJ y en el virus del sarcoma de aves 17 (ASV17) respectivamente. Los genes de *c-fos* y *c-jun* se expresan en bajos niveles en la mayoría de los diferentes tipos de células. Sin embargo, su expresión es inducida temporalmente hasta altos niveles por una gran variedad de estímulos extracelulares.

c-fos y *c-jun* son miembros de un conjunto de genes conocidos como genes de expresión temprana. Este conjunto se define por el hecho de que su expresión es inducida rápidamente por una gran variedad de estímulos extracelulares, aún en la presencia de inhibidores de la síntesis de proteínas. Se ha propuesto que los genes de expresión temprana llevan a cabo su acción al acoplar el estímulo a corto plazo a cambios a largo plazo en el fenotipo celular, como pueden ser la proliferación y la diferenciación celular. Esta hipótesis ha sido reforzada por el descubrimiento de la función de regulación de la transcripción por las proteínas de *c-fos* y *c-jun*.

3.3.2 Estructura.

Las proteínas de *c-fos* (c-Fos) y de *c-jun* (c-Jun) son fosfoproteínas nucleares que están constituidas por 380 y 334 aminoácidos respectivamente. Ambas proteínas tienen una vida media corta (20-90 minutos) y contiene un dominio en el que se repiten periódicamente cada siete aminoácidos un residuo de leucina. A este dominio se le denomina "zipper" de leucina. Adyacente al "zipper" de leucina se encuentra un dominio rico en aminoácidos básicos. Cuando la región del "zipper" de leucina es arreglada en una α -hélice, los residuos de leucina quedan alineados a lo largo de una cara de la hélice. Los residuos de leucina de una α -hélice interactúan con los residuos de leucina presentes en otra α -hélice de una proteína diferente, con lo cual se facilita la dimerización a través de interacciones hidrofóbicas. Por lo tanto, el dominio de "zipper" de leucina facilita la formación de heterodímeros. Esta secuencia está presente en diversos factores de transcripción, tales como las proto-oncoproteínas Fos, Myc y Jun, los factores de transcripción de la levadura GCN4 y yAP-1 y la proteína que se une al elemento de respuesta a cAMP (CREB) (Hope y Struhl, 1987; Kouzarides y Ziff, 1988; Dang *et al.*, 1989; Landschultz *et al.*, 1988; Gonzalez *et al.*, 1989). Esta región conservada está compuesta por dos estructuras: una región rica en aminoácidos básicos (arginina y lisina) y el "zipper" de leucina.

Se ha demostrado (Sassone-Corsi *et al.*, 1988) que el dominio del "zipper" de leucina es necesario para que Fos y Jun formen un heterodímero llamado AP-1. Sin embargo, la presencia de un "zipper" de leucina no es factor suficiente para la formación de dímeros. Fos no forma homodímeros y ni Fos ni Jun pueden formar dímeros con CREB (Dwarki *et al.*, 1990) o GCN4 (O'Shea *et al.*, 1989). Todas las proteínas de la familia de jun (cJun, JunB y JunD) pueden formar tanto homo como heterodímeros, mientras que las proteínas de la familia de fos (cFos, Fra1 y Fra2) no son capaces de asociarse entre sí; solamente se asocian con las proteínas de la familia de jun. Todos los diferentes complejos que se forman reciben el nombre de AP-1.

Pérdidas en el extremo carboxi o amino terminal, así como inserciones o pérdidas en el "zipper" de leucina de Fos y Jun anulan la dimerización. Sin embargo, la mutación de una sola leucina tanto en Fos como en Jun no afecta la formación del heterodímero, como tampoco la mutación de dos residuos de leucina consecutivos en Jun, no así la mutación de dos residuos consecutivos de leucina en Fos (Ransone y Verma, 1990).

La región rica en aminoácidos básicos media la unión del dímero a una región específica del DNA, ya que inserciones o pérdidas en esta región disminuyen o anulan la unión al DNA pero no la formación del dímero. El dímero se une a regiones promotoras que contienen el elemento de respuesta a TPA (12-o-tetradecanoil- forbol-13 acetato) llamado TRE (TPA response element) o sitio de unión a AP-1. Los diferentes complejos AP-1 presentan diferentes actividades de unión al DNA. Los heterodímeros Fos:Jun presentan una mayor actividad de unión al DNA que los homodímeros Jun:Jun. Este aumento en la actividad de unión al DNA de los heterodímeros Fos:Jun es debido a su mayor termoestabilidad que el de los homodímeros de Jun; los heterodímeros se disocian entre 37° y 42° C mientras que los homodímeros se disocian entre 25° y 37° C (Angel y Karin, 1991).

A pesar de que el "zipper" de leucina es el dominio de dimerización principal y que la región básica es el dominio principal de unión al DNA, se debe de mantener presente que la proteína completa interactúa y que aminoácidos fuera de estos dominios también contribuyen a la dimerización y unión del DNA (Curran *et al.*, 1990).

Tanto c-Fos como c-Jun contribuyen a la función de activación de la transcripción del complejo AP-1. Ambas proteínas contienen múltiples dominios de activación. En el caso de Jun se han localizado 3 regiones cortas en el extremo amino terminal que son importantes para la activación de la transcripción. Estas regiones son ricas en aminoácidos con carga negativa y son las únicas regiones del extremo amino terminal que están altamente conservadas entre las tres proteínas de la familia de Jun

(Angel y Karin, 1991). Además existe un dominio de activación relativamente débil en el extremo carboxi terminal (Baichwal y Tjian, 1990). En Fos se han localizado en el extremo carboxi terminal, después de la región del "zipper" de leucina, 3 regiones involucradas en la transactivación de la transcripción. Dos de estas regiones son homólogas a dos de las regiones de activación de Jun ubicadas en el extremo amino terminal, y reciben el nombre de HOB1 y HOB2 (Homology Box 1 y 2) (Sutherland *et al.*, 1992). Así mismo, se ha determinado que existe otro dominio de transactivación en Fos ubicado en el extremo amino terminal (Jooss *et al.*, 1994)

3.3.3 Función de AP-1 en la proliferación y diferenciación celular.

A pesar de que existe una gran cantidad de información respecto a la estructura y regulación del complejo AP-1, aún no se sabe con certeza el papel que juega en la proliferación y la diferenciación celular. Diversas observaciones sugieren que el complejo AP-1 puede controlar la expresión de genes involucrados en la proliferación celular: Se ha observado que la expresión tanto de *c-jun* como la de *c-fos* es rápidamente inducida en varios tipos celulares en respuesta a mitógenos como suero, EGF, TGF α , PDGF, estrógenos y otros (Brenner *et al.*, 1989; Treisman, 1985; Kruijer *et al.*, 1984; Quantin y Breathnach, 1988; Weisz y Bresciani). Células en crecimiento logarítmico contienen niveles más altos del mRNA de *c-jun* que las células privadas de suero (Angel *et al.*, 1988). La expresión desregulada tanto de *c-jun* como de *c-fos* lleva a la transformación neoplásica de fibroblastos de rata (Schütte *et al.*, 1989; Miller *et al.*, 1984). La microinyección de anticuerpos anti-Fos o la transfección del RNA antisentido de *c-fos* en fibroblastos en cultivo inhibe la síntesis de DNA y la proliferación celular (Riabowol *et al.*, 1988; Holt *et al.*, 1986). Transfecciones transientes de varios oncogenes transformantes, incluyendo *src*, *H-ras*, *raf* y *mos* resultan en el incremento en la actividad de AP-1, medida por la activación de genes reporteros dependientes de AP-1 (Wasylyk *et al.*, 1988; Wasylyk *et al.*, 1989). Mientras que estos experimentos indican que el complejo AP-1 es un blanco nuclear para las vías de transmisión de

señales inducidas por mitógenos o por oncoproteínas, aún falta por identificar los genes activados por AP-1 cuyos productos participan en la progresión de la fase G1 a S. Los únicos genes involucrados en el control de crecimiento, que se han detectado, cuya expresión es regulada por AP-1 son algunos genes cuyos productos son factores de crecimiento tales como $TGF\alpha$, $TGF\beta$ e IL2 (Kim *et al.*, 1990; Muegge *et al.*, 1989). La inducción de estos genes, a pesar de que afectan la proliferación celular, no explica como AP-1 participa en el compromiso para la replicación del DNA después del estímulo mitogénico.

Otras observaciones arrojan algunas dudas sobre el papel exclusivo de AP-1 en la proliferación celular. En células PC12, por ejemplo, la expresión de *c-jun* y *c-fos* no solamente es inducida por EGF, el cual es un mitógeno para estas células, sino que también es inducida por NGF, el cual induce el arresto de la división celular y la diferenciación neuronal (Bertel *et al.*, 1989). Sin embargo, parte de esta respuesta a NGF puede ser causada por su efecto inicial de estimulación del crecimiento (Boonstra *et al.*, 1983). De la misma manera, la incubación de células de leucemias mieloides U937 con TPA induce su diferenciación a macrófagos, un proceso que es acompañado por un gran incremento en la expresión de *c-fos* y *c-jun*. En este caso, la diferenciación también está asociada al cese de la división celular (Williams *et al.*, 1990). Así mismo, se ha observado que AP-1 está involucrada en la inducción de $TGF\beta-1$, el cual actúa como un inhibidor del crecimiento en varios tipos celulares (Roberts *et al.*, 1985). El promotor de $TGF\beta-1$ contiene dos TRE los cuales son requeridos para la inducción de $TGF\beta-1$ por TPA, $TGF\beta-1$ y la transactivación por cJun (Kim *et al.*, 1990). Así mismo, la aplicación de $TGF\beta-1$ a varios cultivos celulares induce la expresión de *c-jun* y *c-fos*, mientras que la expresión de RNAs antisentido de *jun* o *fos* bloquea la activación del promotor de $TGF\beta-1$ (Kim *et al.*, 1990; Pertovaara *et al.*, 1989). Estos resultados plantean un problema respecto al papel de AP-1 en la proliferación celular, ya que la inducción de *c-fos* y *c-jun* por $TGF\beta-1$ se ha observado en una gran variedad de líneas celulares sin importar que su crecimiento sea estimulado o inhibido por este agente.

Estas observaciones, aparentemente contradictorias, pueden ser explicadas si se supone que la función del complejo AP-1 es la de activar la transcripción de una variedad de genes en respuesta a la estimulación de receptores presentes en la membrana celular que están involucrados en varias vías de transducción de señales, incluyendo la vía de la proteína cinasa C (PKC). Los genes activados por AP-1 median la respuesta a hormonas polipeptídicas y factores de crecimiento, las cuales incluyen la proliferación y la diferenciación celular. Por lo tanto, más que ser un ejecutor especializado de una única respuesta a estímulos extracelulares, el complejo AP-1 juega un papel general en la transducción de señales de la membrana al núcleo celular. Puede ser que la respuesta que presente la célula al ser inducida la expresión de *c-fos* y *c-jun* y la actividad de AP-1 dependa de otros eventos que aun están por ser identificados. Por ejemplo, la inducción de *c-fos* y *c-jun* junto con un gen que codifica para un factor de transcripción X pueda desencadenar una respuesta proliferativa, mientras que la inducción de *c-fos* y *c-jun* junto con el factor de transcripción Y conduzca a la diferenciación celular (Angel y Karin, 1991). Los factores X y Y pueden ser tanto modificadores de la actividad de AP-1 o actuar independientemente de AP-1 para activar la expresión de genes específicos de proliferación o diferenciación.

3.3.4 Regulación de la expresión de *c-fos* y *c-jun*.

La expresión de los proto-oncogenes *fos* y *jun* es inducida por una gran variedad de agentes, tales como mitógenos, factores de diferenciación y de crecimiento, agentes farmacológicos específicos (como ésteres de forbol, nicotina, bario y ácido fosfatídico), estrés y choque calórico. La inducción es rápida y pasajera y ocurre al nivel de la transcripción. La expresión del gen de *c-fos* aparece pocos minutos después de adicionar el inductor, alcanza su nivel máximo entre 30-120 minutos y es esencialmente indetectable después de 3-8 horas dependiendo del tipo de célula que sea tratada y del estímulo. La inducción de la expresión de *c-fos* se lleva a cabo aún en la presencia de inhibidores de la síntesis de proteínas; de hecho, el tratamiento con inhibidores de la

síntesis de proteínas resulta en la superinducción de *c-fos* debido a la estabilización del mRNA y la eliminación de la autorepresión de la transcripción por Fos (Angel y Karin, 1991). Lo anterior sugiere que la activación de la transcripción de *c-fos* después del tratamiento mitogénico se lleva a cabo por factores pre-existentes (Ransome y Verma, 1990).

Se sabe que algunos de los agentes que inducen la expresión de *fos* activan las vías de transducción de señales que involucran tanto a la proteína cinasa C como a la proteína cinasa A dependiente de cAMP. La inspección de la región promotora del gen de *c-fos* humano (Figura 5) revela la presencia, entre la posición -1060 a -1300, de un elemento de respuesta a estrógenos (ERE) (Weisz y Rosales, 1990). En el caso del proto-oncogen *c-fos* murino se han identificado ERE tanto en el extremo 5' como en el 3' (Hyder *et al.*, 1991a; Hyder *et al.*, 1991b). Así mismo, se han localizado dos elementos de respuesta dependientes de cAMP (CREs) en las posiciones -60 y -350 (respecto al sitio de inicio de la transcripción) los cuales son requeridas para la inducción por agonistas de la vía del adenilato ciclasa. Localizado entre las posiciones -299 y -320 está el elemento de doble simetría (DSE), llamado también elemento de respuesta a suero (SRE). Esta región es esencial para la inducción por suero, así como por diversos factores de crecimiento: epidérmico (EGF), de fibroblastos (FGF), derivado de plaquetas (PDGF) y nervioso (NGF), por ésteres de forbol, por luz ultravioleta y por los oncogenes *src* y *ras* (Ransome y Verma, 1990). La proteína de 67 KDa que se une a DSE es llamada factor de respuesta al suero (SRF). Esta proteína actúa como dímero y requiere de fosforilaciones para la activación transcripcional de genes que contienen en su región promotora DSE. Otra proteína de 62 KDa también ha sido implicada en la unión a DSE ya que forma un complejo terciario con SRF. Inmediatamente hacia el extremo 3' de DSE hay un elemento de respuesta a TPA (TRE) capaz de unir los complejos Fos/Jun.

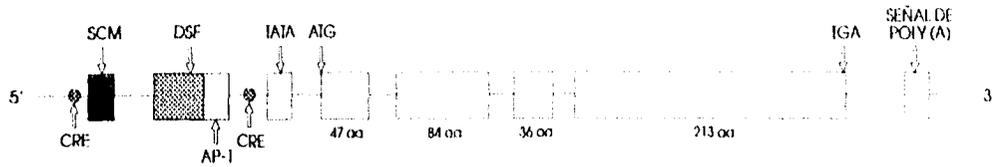


Figura 5. Estructura del gen *c-fos* (ratón) (Ransone y Verma, 1990).

En contraste con la extensiva ubicación de elementos reguladores en el promotor de *c-fos*, se sabe relativamente poco de los mecanismos de inducción del proto-oncogen *c-jun*. Parece ser que los agentes que usualmente inducen *c-fos* también inducen la transcripción del gen de *c-jun*. Se ha identificado un ERE dentro de la secuencia codante del gen de *c-jun* (Hyder *et al.*, 1995), sin embargo no se ha encontrado ningún elemento de respuesta a suero en la región que contiene 300 pares de bases hacia el extremo 5' del sitio de inicio de la transcripción. En esta región tampoco se ha encontrado un CRE, sin embargo, se ha detectado un sitio de unión para AP-1 (TGACATAC) en la posición -70 respecto al inicio de la transcripción que es reconocido por el complejo Fos-Jun (Ransone y Verma, 1990). Hacia el extremo 5' de este TRE se encuentra una caja CAAT y una caja GC. Experimentos de unión al DNA sugieren que estas secuencias son reconocidas por los factores de transcripción CTF y SP1 respectivamente (Angel y Karin, 1991).

3.3.5 Regulación de la expresión de proto-oncogenes por hormonas esteroides.

Uno de los principales efectos de los estrógenos sobre el útero y las glándulas mamarias en los mamíferos es la replicación y proliferación celular. Hasta el momento no se sabe con exactitud el mecanismo específico por medio del cual los estrógenos controlan la proliferación celular. La hipótesis que prevalecía hasta hace algunos años era que los estrógenos actuaban como un mitógeno indirecto, por ejemplo, podrían actuar via la secreción, inducida por estrógenos, de factores de crecimiento polipeptídicos, los cuales actuaban sobre sus receptores ubicados en la membrana

celular (Davidson y Lippman, 1989). Sin embargo, recientemente se ha demostrado que los estrógenos inducen la expresión de genes que son inducidos por agentes mitogénicos los cuales han sido relacionados con proliferación, como son los proto-oncogenes.

Con base en estas observaciones varios autores han buscado este efecto modulador de los estrógenos sobre proto-oncogenes. En el útero de ratas ovariectomizadas se ha demostrado que la administración del 17β -estradiol incrementa la expresión de los proto-oncogenes nucleares *c-myc*, *n-myc* (Murphy *et al.*, 1987) *c-fos*, *c-jun*, *jun-B* y *jun-D* (Weisz y Bresciani, 1988; Weisz *et al.*, 1990; Cicatiello *et al.*, 1992). Más aún, estos estudios han demostrado que estos proto-oncogenes son inducidos muy poco tiempo después de la administración de estradiol, por lo cual son considerados genes tempranos. En el caso de *N-myc*, *c-jun*, *c-fos* y *jun-D* la concentración de mRNA de estos genes empieza a incrementarse, en el útero de la rata, 15 a 30 minutos después de la administración del E_2 , y en el caso de *c-myc* y *jun-B* empieza a aumentar 60 a 90 minutos después de la administración de la hormona. Tanto en el caso de *c-myc* como en el caso de *c-fos* se presentan dos picos de máxima expresión. El primer pico de máxima expresión de *c-myc* (5 a 9-veces respecto a las ratas tratadas con vehículo) se observa 3-4 horas después del tratamiento con E_2 y el segundo pico (5-veces) se observa a las 28-45 h después del tratamiento (Travers y Knowlers, 1987; Murphy *et al.*, 1987; Weisz y Bresciani, 1988). *c-fos* presenta el primer pico de máxima expresión (10 a 40-veces) 30 a 180 minutos después del tratamiento con E_2 , baja a niveles basales a las 18h y el segundo pico (5 a 8-veces) se presenta 24 a 33 horas después de la administración (Weisz y Bresciani, 1988; Loose-Mitchell *et al.*, 1988; Cattaneo y Maggi, 1990). En cambio, *N-myc*, *c-jun*, *jun-B* y *jun-D* solamente presentan un solo pico de máxima expresión. *N-myc* presenta la máxima expresión (10-veces) 30 minutos después de la administración de la hormona, *c-jun* lo presenta 1-3 horas (4 a 7-veces), *jun-B* lo presenta 2-3 horas (5 a 12-veces) y *jun-D* 90 a 180 minutos (2 a 5-veces) después de la administración del E_2 (Murphy *et al.*, 1987; Weisz *et al.*, 1990; Cicatiello *et al.*, 1992; Nephew *et al.*, 1993; Webb *et al.*, 1993).

Por medio de estudios de hibridación *in situ* se ha podido detectar en que tipo celular del útero se presenta este aumento en la expresión de los diferentes proto-oncogenes. En el útero de ratas ovariectomizadas tratadas con vehículo se observan muy bajos niveles de expresión de *c-fos*, *jun-B* y *jun-D* y no se encuentran localizados en ningún tipo celular específico. Al tratar las ratas con E₂ se presenta un incremento notorio en el mRNA de *c-fos*, *jun-B* y *jun-D* en las células del epitelio luminal y glandular. En el caso de *jun-D* también se observa un ligero incremento en la expresión de este gen en el miometrio (Nephew *et al.*, 1994; Nephew *et al.*, 1995). Estos incrementos son aún notorios 12 horas después de la administración de la hormona y regresan a niveles basales a las 24 horas. Estas observaciones indican que el incremento en los niveles de mRNA de estos genes detectados por Northern Blot o por ensayos de "nuclear run-on transcription" pueden ser principalmente atribuidos al aumento de la expresión de estos genes en el epitelio luminal y glandular del endometrio uterino. En cambio, *c-jun* presenta un patrón totalmente diferente. En las ratas tratadas con vehículo el transcrito de *c-jun* se detecta en las células del epitelio luminal y débilmente en el miometrio. Después de 3 horas de tratamiento con estradiol el mRNA de *c-jun* prácticamente desaparece del epitelio luminal y presenta un incremento importante en miometrio (Nephew *et al.*, 1994). Lo anterior indica que el incremento en los niveles de mRNA detectado por Northern Blot y por ensayos de "nuclear run-on transcription" se deben principalmente a la expresión de *c-jun* en el miometrio.

Este incremento en los niveles del mRNA de los proto-oncogenes *c-fos*, *c-jun*, *jun-B* y *jun-D* por E₂ es bloqueado por actinomocina D (inhibidor de la transcripción), pero no por puromicina o cicloheximida (inhibidores de la síntesis de proteína) (Loose-Mitchell *et al.*, 1988; Weisz *et al.*, 1990). Esto, junto con los ensayos de "nuclear run-on transcription" (Weisz y Bresciani, 1988; Cicatiello *et al.*, 1992) indican que los efectos del E₂ sobre la expresión de estos proto-oncogenes ocurren a nivel transcripcional.

El incremento en los niveles del mRNA de los proto-oncogenes se traduce en un incremento en la proteína de estos; se ha observado que la proteína de *c-fos* y *jun-B* se incrementa 2-3 horas después de la administración de estrógenos en las células del epitelio luminal y glandular (Papa *et al.*, 1991; Webb *et al.*, 1993).

Los efectos de los estrógenos sobre la regulación de la expresión de proto-oncogenes nucleares son tejido-específico; se ha determinado que la expresión de estos proto-oncogenes no es inducida por E₂ en pulmón, riñón, hígado, músculo, bazo, corazón e intestino grueso (Murphy *et al.*, 1987; Weisz y Bresciani, 1988, Weisz *et al.*, 1990). Estas diferencias entre los diversos tejidos puede ser debido a los requerimientos de factores de transcripción tejido-específicos importantes para la regulación (Schuchard *et al.*, 1993). Así mismo, se ha observado que estos efectos también son hormona específicos, ya que no se ha logrado inducir la expresión de estos proto-oncogenes, en útero de ratas ovariectomizadas, al administrarles glucocorticoides, andrógenos o progesterona (Loose-Mitchell *et al.*, 1988; Webb *et al.*, 1993; Nephew *et al.*, 1993; Nephew *et al.*, 1995). También se ha observado que no todos los proto-oncogenes responden a estrógenos; la expresión de los proto-oncogenes *abl*, *bas*, *erb-A*, *ets*, *fms*, *fps/fes*, *mos*, *myb*, *raf*, *Ki-ras*, *N-ras*, *rel*, *sis*, *src* y *B-lym* no es inducida por estrógenos en útero de ratas ovariectomizadas (Weisz y Bresciani, 1988).

Con respecto a p53, no existen referencias en la literatura donde se informe si las hormonas esteroideas juegan algún papel en la regulación de la expresión de este gen supresor de tumores en el útero de la rata.

La progesterona (P₄) inhibe la proliferación celular inducida por estrógenos y causa la diferenciación del endometrio a uno de tipo secretor. Con base en estas observaciones algunos autores han buscado el mecanismo molecular por medio del cual se lleva a cabo esta función. Se ha observado que la P₄ reduce considerablemente los niveles del mRNA de *c-fos* inducido por E₂ y bloquea el efecto represivo del E₂

sobre la expresión de *c-jun* en el tejido epitelial (Kirkland *et al.*, 1992; Bigsby y Li, 1994). En cuanto a *jun-B*, el tratamiento con E₂ + P₄ no altera la respuesta ni del útero completo ni del epitelio hacia el E₂, esto es, la respuesta fue la misma que en las ratas tratadas solamente con estradiol. Esto plantea la posibilidad de que la acción antagonista de la progesterona en el crecimiento uterino estrógeno-inducida sea mediado, en parte, por la supresión de la transcripción de *c-fos* y la inducción de la expresión de *c-jun* en el epitelio uterino (Kirkland *et al.*, 1992; Bigsby y Li, 1994).

3.4 P53

3.4.1 Estructura primaria de p53.

La proteína de p53 (P53) está compuesta por 393 aminoácidos y en condiciones normales se encuentra localizada en el núcleo. El extremo amino terminal es muy ácido con una carga neta que es similar a la que presentan los transactivadores de la transcripción, tales como la proteína Gal-4. El extremo carboxi terminal es rico en aminoácidos básicos similar a aquellos dominios que se unen al DNA y tiene tres señales de localización nuclear (NLS). Hay cinco regiones en la secuencia primaria de P53 que son altamente conservadas a lo largo de la evolución. Se cree que estas regiones sirven para retener una estructura y/o función necesaria. Esta proteína tiene una vida media corta (usualmente menos de 30 minutos), inhibe el crecimiento de células tumorales en cultivo e inhibe la transformación de fibroblastos por oncogenes cooperativos. Así mismo, presenta actividad de unión al DNA, la cual es requerida para su función de transactivador de la transcripción. P53 forma complejos con varias proteínas oncogénicas provenientes de virus. Por ejemplo, se unen con el antígeno largo T de SV40, con E6 de HPV (papillomavirus humano) y con la proteína E1B de adenovirus (Ludlow, 1993; Vousden, 1993; Moran, 1993).

3.4.2 Función molecular de p53.

La secuencia primaria de p53 predice un papel para la proteína p53 de transactivador de la transcripción. Los primeros estudios de la posible función de p53 como regulador de la transcripción se llevaron a cabo al fusionar p53 al dominio de Gal4 que se une al DNA. La cotransfección de células de levadura o de mamífero con un gen reportero que responde a Gal4 y al gen fusionado p53/Gal4 dió lugar a una gran inducción de la actividad del gen reportero comparada con la actividad inducida únicamente por Gal4 (Unger *et al.*, 1990). La región de p53 involucrada en la transactivación está localizada en el dominio ácido del extremo amino terminal y está ubicado en los primeros 42 aminoácidos. Estos resultados indicaron que p53 puede funcionar como transactivador de la transcripción cuando es fusionado a un dominio que se une al DNA. Recientemente se determinó un sitio consenso donde se une específicamente p53. Este consiste en dos copias de un elemento de diez pares de bases que tiene la siguiente secuencia:

$$5' - \text{Pu Pu Pu C (NT)} \text{ (T/A) G Py Py Py} - 3'$$

El espacio entre los monómeros es entre cero y trece pares de bases. Estudios *in vitro* demostraron que p53 se une a esta secuencia, pero no así p53 tipo mutado como 143A, 175H y 248W.

Basándose en la naturaleza palindrómica del DNA al cual se une específicamente p53 se ha especulado que éste se une al DNA ya sea como homodímero, homotetrámero o posiblemente como heterodímero formando un complejo con otra proteína nuclear.

La identificación de elementos que responden a p53 refuerzan la idea de que esta secuencia es un sitio de unión específico para p53. Las secuencias de DNA a las cuales se une p53 han sido funcionalmente identificadas al aislar y caracterizar los

elementos de respuesta a p53 en genes que son regulados por p53, como es el caso del promotor de la creatinina fosfoquinasa específica de músculo murino (MCK). En este promotor hay tres copias imperfectas del sitio consenso donde se une el monómero de p53 al DNA. El gen de MCK es un marcador de diferenciación específico de músculo. El elemento de respuesta a p53 está localizado entre -2800 y -3300 pares de bases hacia el extremo 5' del sitio de inicio de la transcripción. A esta región solamente se une p53 pero no la tipo mutado. La localización del sitio de unión de p53 en el promotor de MCK sugiere que p53 puede funcionar como un transactivador de la transcripción sin necesidad de Gal4.

Se ha identificado otro elemento de respuesta a p53 en el tercer exón de GADD45, el cual es inducido después de que las células que expresan p53 son expuestas a radiaciones gama. En células que tienen p53 tipo mutado o que carecen de la proteína p53 al someterlas a radiaciones gama se induce muy pobremente la expresión de este gen o no se induce en lo absoluto. El elemento de respuesta en GADD45 coincide en diecinueve de las veinte bases que conforman la secuencia consenso.

En estudios de transfección temporal se observó la existencia de algunos genes, como *c-fos* y *c-jun*, cuya expresión es regulada por p53 aún cuando dentro de su región promotora no existe un sitio de unión para esta proteína (Ginsberg *et al.*, 1991). La expresión de estos genes es suprimida por p53. En la Tabla 2 se mencionan algunos de los promotores que son regulados por p53.

La gran diversidad de promotores que son inhibidos por p53 sugiere que esta proteína opera por un mecanismo general en la regulación de la transcripción de estos genes. De acuerdo con lo anterior, se ha demostrado que (Seto *et al.*, 1992) p53 puede suprimir la expresión de genes por medio de la inhibición de la transcripción al interactuar con la proteína que se une a la caja TATA (TBP). En un ensayo de transcripción in vitro se usó la proteína purificada de p53, extractos nucleares y un gen

quimérico compuesto por el promotor mínimo y el gen reportero CAT. La adición de p53, pero no la de p53m, al ensayo de transcripción dió lugar a la disminución de la transcripción de la quimera. La caracterización bioquímica de este efecto demostró una interacción entre la proteína p53 y TBP. La proteína p53m no se unió a TBP.

Tabla 2. Efecto de p53 en la actividad de promotores en estudios de transfección temporal (Zambetti y Levine, 1993).

Promotores que son suprimidos por p53:

c-Fos de humano

c-Jun de humano

IL-6 de humano

β -Actina de humano

MDR-1 de humano

Promotores que no son suprimidos por p53:

EGF de humano

Ha-Ras de humano

β -Actina de pollo

β -Actina de rata

hsc 70 de rata

p53 de rata

Con base en lo anterior, se concluye que p53 puede influenciar la expresión génica por medio de la transactivación positiva de genes que contienen en su DNA un elemento de unión a p53 y en una manera negativa por medio de la supresión de la transcripción de algunos genes que no contienen dicho sitio de respuesta a p53. Estas observaciones predicen un modelo para la función de p53 en la supresión de tumores

que incluye la inhibición de la transcripción de genes que promueven el crecimiento, tales como *c-fos* y *c-jun*, y la inducción de genes que están involucrados en el control negativo del crecimiento y de la diferenciación

3.4.3 Regulación de la función de p53.

Existen múltiples mecanismos para la regulación de la función de p53, entre los cuales se encuentran:

- 1.- La expresión de p53 es inducida por 17β -estradiol en líneas celulares de cáncer de mama humano (Thompson *et al.*, 1990; Hurd *et al.*, 1995).
- 2.- La función de p53 es inactivada al sufrir una mutación. Este tipo de inactivación es frecuentemente observada en varios tipos de carcinomas. Así mismo, p53 mutado puede actuar como oncogen ya que se une a p53 tipo silvestre formando oligómeros, los cuales no presentan la función normal de p53.
- 3.- La inactivación de la función de p53 también puede ocurrir a través de la formación de complejos con productos de oncogenes virales tales como el antígeno T largo de SV40, la proteína E1B de adenovirus tipo 5 y el producto del gen E6 de papilomavirus humano tipo 16 y 18 (Ludlow, 1993; Moran, 1993; Vousden, 1993). Al unirse estas proteínas virales a p53 impiden que este lleve a cabo su función tanto de activador de la transcripción como de inhibidor de la misma. En este aspecto, estas proteínas virales presentan similitudes a ciertas proteínas mutadas de p53.
- 4.- La función de p53 puede ser regulada negativamente por el producto del gen MDM-2. El producto del gen MDM-2 interactúa con la proteína de p53. Basado en estas observaciones se ha postulado que MDM-2 puede ser un oncogen ya que inhibe la función de p53. La proteína de MDM-2 contiene una señal de localización nuclear, un

dominio de aminoácidos ácidos y dos dedos de zinc, lo cual sugiere que MDM-2 puede funcionar como activador de la transcripción. Se ha especulado que MDM-2 puede regular la expresión de genes que promueven el crecimiento y que p53 puede inhibir la expresión de estos genes bloqueando la actividad de unión al DNA de MDM-2 u otra función transactivadora de MDM-2. Recientemente se descubrió que p53 también puede inducir la expresión del gen de MDM-2. Basados en estos resultados se ha propuesto un modelo de autorregulación para la expresión de p53 (Zambetti y Levine, 1993). En células normales puede existir un balance muy fino entre bajos niveles de p53 y la proteína de MDM-2. Un cambio en este balance a un exceso de la proteína de MDM-2 puede promover el crecimiento celular mientras que un exceso de la proteína de p53 puede inhibir la proliferación celular. Un incremento en los niveles de la proteína de p53 resulta en el incremento de la expresión de los genes que responden a p53, incluyendo el gen de MDM-2. La elevación de los niveles de MDM-2 podría, a su vez, inhibir la transactivación por p53. Este círculo podría mantener el equilibrio entre la proteína supresora de tumores p53 y el producto proto-oncogénico de MDM-2.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se ha propuesto que uno de los primeros pasos mediante el cual los estrógenos inducen la replicación del DNA y la proliferación celular en el útero de las ratas ovariectomizadas es mediante la inducción de la expresión de factores de transcripción, entre los cuales se encuentran los proto-oncogenes y los genes supresores de tumores. Se ha demostrado que la expresión de los proto-oncogenes *c-fos* y *c-jun* es inducida en el útero de las ratas ovariectomizadas poco tiempo después de la administración de 17β -estradiol. Sin embargo, no se ha estudiado si la expresión de estos genes es regulada por E_2 en condiciones fisiológicas, como en el ciclo estral. Así mismo, tampoco se ha estudiado el efecto que tiene el E_2 sobre los genes supresores de tumores, como p53, los cuales están íntimamente relacionados con los proto-oncogenes. Por ello, en este trabajo se propuso determinar el patrón de expresión de los proto-oncogenes *c-fos* y *c-jun* y del gen supresor de tumores p53 en el útero de ratas intactas durante las diferentes fases del ciclo estral y compararlo con la expresión de estos genes en el útero de ratas ovariectomizadas tratadas con dosis farmacológicas de E_2 .

OBJETIVOS

5.1 OBJETIVOS GENERALES.

Determinar el efecto que tiene el estradiol sobre la regulación de la expresión de los proto-oncogenes *c-fos* y *c-jun* y el gen supresor de tumores p53, en el útero de rata, tanto en condiciones farmacológicas como fisiológicas.

5.2 OBJETIVOS PARTICULARES.

1. Determinar la regulación de la expresión de los proto-oncogenes *c-fos* y *c-jun* y del gen supresor de tumores p53 en el útero de ratas ovariectomizadas tratadas con 17 β -estradiol (Modelo Farmacológico).
2. Conocer el patrón de expresión de *c-fos*, *c-jun* y p53 en el útero de la rata durante las diferentes fases del ciclo estral (Modelo Fisiológico).
3. Establecer a través del ciclo estral una correlación entre la expresión de *c-fos* y *c-jun* con la expresión de p53 en el útero de la rata.
4. Comparar la regulación de la expresión de *c-fos*, *c-jun* y p53 por estradiol entre condiciones farmacológicas y fisiológicas.

HIPÓTESIS DE TRABAJO

Ya que los estrógenos inducen la proliferación del epitelio uterino en las ratas ovariectomizadas, se espera que la expresión de los proto-oncogenes *c-fos* y *c-jun* sea inducida mientras que la de p53 sea inhibida por E₂. Este mismo comportamiento se espera observar en la fase del proestro del ciclo estral, ya que en esta etapa se observa la máxima proliferación del epitelio luminal, estroma y miometrio y los niveles de estrógenos alcanzan su máximo valor. En las fases restantes del ciclo estral se espera tener una correlación inversa entre los niveles de *c-fos* y *c-jun* con respecto a p53.

MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 SOLUCIONES

1.-Medio de cultivo líquido LB.

10 g NaCl.

5 g extracto de levadura.

10 g peptona.

Agua c.b.p. 1000 ml.

Se ajustó el pH a 7.5 y se esterilizó por autoclave.

2.-Medio de cultivo en placa LB.

10 g NaCl.

5 g extracto de levadura.

10 g peptona.

5 g agar.

Agua c.b.p. 1000 ml

Se ajustó el pH a 7.5 y se esterilizó por autoclave.

3.-Solución de ampicilina 12.5 mg/ml.

12.5 mg/ml ampicilina.

Amortiguador de fosfatos 0.6 M pH= 6.4.

Se esterilizó por filtración en Millipore 0.45 mm. Se usó a una concentración de 35-50 mg/ml.

4.-Solución STE (pH 8).

0.1 M NaCl.

10 mM Tris-HCl (pH = 8).

1 mM EDTA (pH = 8).

Se esterilizó por autoclave.

5.-Solución I.

50 mM glucosa.

25 mM Tris-HCl (pH 8).

10 mM EDTA (pH 8)

Se esterilizó por autoclave y se guardó a 4°C.

6.-Solución de lisozima.

10 mg/ml lisozima.

10 mM Tris-HCl (pH = 8).

Se preparó justo antes de usarse.

7.-Solución II.

0.2 N NaOH (recién diluido de una solución 10 N de NaOH).

1% SDS.

8.-Solución III.

60 ml acetato de potasio 5 M.

11.5 ml ácido acético glacial.

28.5 ml agua.

La solución resultante es 3 M con respecto al potasio y 5 M con respecto al acetato.

9.-Solución TE (pH 8.0).

10 mM Tris-HCl (pH 8).

1 mM EDTA (pH 8).

10.-RNAsa pancreática.

10 mg/ml RNAsa pancreática libre de DNAsa.

10 mM Tris-HCl (pH = 7.5).

15 mM NaCl.

La solución se calentó 15 minutos a 100° C. Se permitió que se enfriara a temperatura ambiente y se guardó en alícuotas a -20° C.

11.-Fenol saturado pH > 7.8

Se licuó el fenol a 68° C y se adicionó 8-hidroxiquinoleína a una concentración final de 0.1%. Se adicionó un volumen igual de Tris-HCl 0.5 M (pH 8) y se agitó durante 10 minutos, después de los cuales se descartó la fase acuosa (superior). Se repitió la operación dos veces más y se adicionó un volumen igual de Tris-HCl 0.1 M (pH 8). Se agitó durante 15 minutos y se descartó la fase acuosa. Se repitió la misma operación hasta que el pH del fenol fue superior a 7.8. El fenol se almacenó con 0.1 volúmenes de Tris-HCl 0.1 M (pH 8) conteniendo 0.2% de β-mercaptoetanol. Se almacenó en un frasco obscuro a 4° C.

12.-Solución fenol-cloroformo.

1 volumen de fenol saturado pH > 7.8.

1 volumen de cloroformo.

Se preparó justo antes de usarse.

13.-Acetato de sodio 3 M (pH 5.2).

3 M acetato de sodio.

Se ajustó el pH con ácido acético glacial y se esterilizó por autoclave.

14.-TBE 10 X (25 mM).

54 g Trizma base.

27.5 g ácido bórico.

20 ml EDTA 0.5 M (pH 8).

Agua cbp 500 ml.

Se esterilizó por autoclave.

15.-Gel de agarosa 1% en TBE.

1.2 g agarosa.

120 ml TBE 0.5X.

0.5 µg/ml bromuro de etidio.

16.-Amortiguador de carga para DNA 6X (Loading Buffer).

0.25 % azul de bromofenol.

0.25 % xilencianol.

30.0 % glicerol.

Se preparó en condiciones estériles y se guardó a 4° C.

17.-Amortiguador de carga para RNA 6X (Loading Buffer).

50 % glicerol.

1 mM EDTA (pH 8.0).

0.25 % azul de bromofenol.

0.25 % xilencianol.

18.-TRIzol Reactivo para la extracción de RNA (Gibco BRL).

Tiocianato de guanidina

Fenol

β-mercaptoetanol

19.-H₂O-DEPC.

Se mezcló 1 ml de dietilpirocarbonato (DEPC) con 9 ml de alcohol etílico absoluto y se aforó a 1000 ml con H₂O destilada. Se colocó en baño de temperatura a 37° C por dos horas y se esterilizó por autoclave.

20.-MOPS 12X.

0.1 M MOPS (ácido 3-[N-morfolino] propanesulfónico).

40 mM acetato de sodio.

5 mM EDTA

Se preparó con H₂O + DEPC y se esterilizó por filtración.

21.-NaOH 0.5 N + NaCl 1.5 M.

20 g NaOH.

87.66 g NaCl.

Agua cbp 1000 ml. Se esterilizó por autoclave.

22.-Tris-HCl 1 M (pH 7.4) + NaCl 1.5 M.

157.64 g Tris-HCl.

87.66 g NaCl.

Agua 800 ml.

Se ajustó el pH a 7.4, se aforó a 1000 ml y se esterilizó por autoclave.

23.-SSC 20X

175.3 g NaCl.

88.2 g citrato de sodio.

800 ml agua.

Se ajustó el pH a 7.0, se aforó a 1000 ml y se esterilizó por autoclave.

24.-SDS (Dodecil sulfato de sodio) 10 %.

10 g SDS.

90 ml agua.

Se calentó a 68° C hasta que se disolvió completamente. Se ajustó el pH a 7.0, se aforó a 100 ml y se esterilizó por autoclave.

25.-EDTA 0.5 M (pH 8)

186.1 g de Na₂EDTA * 2 H₂O (Etilendiaminotetraacetato de sodio).

800 ml de H₂O.

Se ajustó el pH a 8.0, se aforó a 1000 ml y se esterilizó por autoclave.

26.-Reactivo de Denhardt 100X.

10 g Ficoll tipo 400.

10 g polivinilpirrolidina.

10 g Albúmina sérica bovina (ASB).

Agua cbp 500 ml.

Se esterilizó por filtración y se guardó a - 20° C.

27.-PB 0.6 M pH 6.5 (Amortiguador de fosfatos)

Se disolvieron 21.3 g de Na₂HPO₄ en 250 ml de agua. En otros 250 ml de agua se disolvieron 20.7 g de NaH₂PO₄. A la solución de fosfato dibásico se adicionó poco a poco la solución de fosfato monobásico hasta que se alcanzó el pH deseado.

28.-Sephadex G-50.

10 g de sephadex G-50 se lavaron varias veces con 160 ml de agua desionizada para eliminar el dextran soluble. Se equilibró la resina con TE (pH 8) y se esterilizó por autoclave.

29. - 17 β -estradiol (0.067 mg/ml).

10.2 mg de 17 β -estradiol se disolvieron en 10 ml de etanol absoluto. Se tomaron 147.06 μ l de esta solución y se disolvieron en 77.94 μ l de etanol absoluto + 2.025 ml de solución isotónica salina.

7.2 MÉTODOS

7.2.1 Transformación de bacterias competentes.

1. Se utilizaron bacterias *E. coli* DH5 α competentes (Gibco BRL). Se descongeló un tubo con las bacterias competentes en la palma de la mano, después de lo cual se colocaron en un baño de hielo por 10 minutos.

2. Se tomaron 150 μ l de bacterias y se colocaron en un tubo eppendorf estéril frío. Se le agregó 10 ng del plásmido con el cual se transfectaron y se dejó en el hielo por 30 minutos. Los plásmidos que fueron transfectados son: pGEM-1 el cual tenía integrado el cDNA de p53 de ratón, pSP65 el cual tenía integrado el cDNA de *c-fos* de humano y pUC18 el cual tenía integrado el cDNA de *c-jun* de humano.

3. Se colocó el tubo en un baño de agua a 42° C por 90 segundos y después se transfirió a un baño de hielo por 2 minutos. Se agregó 800 μ l de medio de cultivo LB al tubo y se colocó en un horno a 37° C por 45 minutos.

4. Se tomaron 100 μ l y se colocaron en cajas petri que contenían medio de cultivo LB sólido + 20 μ g/ml de ampicilina. Las bacterias se extendieron en la placa con un rodillo de vidrio y se dejaron incubando a 37° C por 12-16 horas.

7.2.2 Amplificación de los plásmidos.

1. Se tomó una colonia de la placa y se sembró en 500 ml de medio líquido LB que contiene de 35 a 50 $\mu\text{g/ml}$ de ampicilina. Se incubó a 37° C con agitación por 12-16 horas.

2. Se transfirió la solución a dos tubos Beckman de 400 ml y se colocó en hielo 10 minutos después de los cuales se centrifugó a 4,000 rpm por 15 minutos a 4° C. Se decantó el sobrenadante, se resuspendió la pastilla en 100 ml de solución STE fría y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones.

3. Se decantó el sobrenadante, se resuspendió la pastilla en 18 ml de Solución I y se incubó 10 minutos a temperatura ambiente. Se adicionó 2 ml de lisosima (10 mg/ml) recién preparada y 40 ml de Solución II recién preparada. Se mezcló invirtiendo gentilmente los tubos y se incubó a temperatura ambiente por 5-10 minutos. Se agregó 20 ml de Solución III fría, se mezcló y se colocó en hielo por 10 minutos.

4. Se centrifugó el lisado bacteriano a 4,000 rpm por 15 minutos a 4° C. Se filtró el sobrenadante por 4 capas de gasa estéril y se colocó en un tubo de centrifuga. Se le adicionó 0.6 volúmenes de isopropanol, se mezcló bien y se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos.

5. Se centrifugó a 5,000 rpm por 15 minutos a temperatura ambiente. Se decantó el sobrenadante y la pastilla se lavó con etanol al 70% a temperatura ambiente. Se decantó el etanol y se disolvió la pastilla en 3 ml de TE (pH 8).

6. Se adicionó RNAsa pancreática libre de DNAsa a una concentración final de 10 $\mu\text{g/ml}$ y se incubó la mezcla por 1 hora a temperatura ambiente.

7. Se extrajo el DNA con un volumen igual de fenol-cloroformo y se centrifugó a 12,000 rpm por 10 minutos. Se tomó la fase acuosa y se precipitó con 2.5 volúmenes de etanol absoluto frío por 12 horas a -20° C.

8. Se centrifugó a 14, 000 rpm por 20 minutos a 4° C y se desechó el sobrenadante. La pastilla se disolvió en TE (pH 8). Se hicieron diluciones 1:100 y se leyó la absorbancia de estas muestras a las siguientes longitudes de onda : 260, 280 y 310 nm. Se determinó la concentración de DNA mediante la siguiente fórmula: 1 unidad de Absorbancia a 260 nm = 50 µg de DNA /ml. También se determinó la pureza del DNA por medio de la relación de absorbancias obtenida a 260 y 280 nm (260/280 nm).

9. Para determinar la integridad de los plásmidos obtenidos estos se observaron en un gel de agarosa al 1%, el cual se corrió en TBE 0.5X a 80 V por una hora.

7.2.3 Digestión enzimática de los plásmidos.

Plásmido con p53 integrado.

El cDNA de p53 de ratón estaba inserto en el plásmido pGEM-1

1. Se colocó en un tubo eppendorf:

40 µg de plásmido purificado pGEM-1 con p53 integrado.

5 µl de amortiguador 10X para BamH I.

5 µl de BamH I (60 unidades).

Agua estéril cbp 50 µl.

2. Se mezcló perfectamente bien y se incubó a 37° C durante 12 horas.

Plásmido con *c-fos* integrado.

El cDNA de *c-fos* de humano estaba inserto en el plásmido pSP65.

1. Se colocó en un tubo eppendorf:

60 µg de plásmido purificado pSP65 con *c-fos* integrado.

5 µl de amortiguador 10X para Eco R I.

4 µl de Eco R I (80 unidades).

Agua estéril cbp 50 µl.

2. Se mezcló perfectamente bien y se incubó a 37° C durante 12 horas.

3. Se extrajo la muestra con un volumen igual de fenol-cloroformo y se centrifugó a 12,000 rpm por 10 minutos a 4° C. Se tomó la fase acuosa y se precipitó con 2.5 volúmenes de etanol absoluto + 0.1 volúmenes de acetato de sodio 3 M a -20° C por 12 horas.

4. Se centrifugó la muestra a 12,000 rpm por 20 minutos. Se desechó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 20 µl de agua estéril y se le agregó:

5 µl amortiguador 10X para Pst I.

4.5 µl de Pst I (90 unidades)

Agua estéril cbp 50 µl.

5. Se mezcló perfectamente bien y se incubó a 37° C durante 12 horas.

Plásmido con *c-jun* integrado.

El cDNA de *c-jun* de humano estaba inserto en el plásmido pUC18.

1. Se colocó en un tubo eppendorf:

50 μ g de plásmido purificado pUC18 con *c-jun* integrado.

5 μ l de amortiguador 10X para Hind III

3.5 μ l de Hind III (70 unidades).

Agua estéril cbp 50 μ l.

2. Se mezcló perfectamente bien y se incubó a 37° C durante 12 horas.

3. Se extrajo la muestra con un volumen igual de fenol-cloroformo y se centrifugó a 12,000 rpm por 10 minutos a 4° C. Se tomó la fase acuosa y se precipitó con 2.5 volúmenes de etanol absoluto + 0.1 volúmenes de acetato de sodio 3 M a -20° C por 12 horas.

4. Se centrifugó la muestra a 12,000 rpm por 20 minutos. Se desechó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 20 μ l de agua estéril y se le agregó:

5 μ l amortiguador 10X para Pst I.

6 μ l de Pst I (60 unidades)

Agua estéril cbp 50 μ l.

5. Se mezcló perfectamente bien y se incubó a 37° C durante 12 horas.

7.2.4 Purificación del cDNA.

Una vez que se cortaron los plásmidos con las enzimas de restricción se purificaron los cDNAs por medio de electroelución.

1. Los plásmidos digeridos se corrieron en un gel de agarosa al 1% en TBE 0.5X a 80 V por 2 horas.

2. Con un bisturí se cortó el segmento del gel que contenía el cDNA, se colocó dentro de una bolsa de diálisis y se le agregó 300 μ l de TE (pH 8). Se colocó la bolsa de diálisis dentro de una cámara de electroforesis y se migró la banda a 80 V en TBE 0.5X por 1 hora. Se invirtió el sentido de la corriente y se migró a 80 V por 45 segundos.

3. Se tomó la solución de TE que se encontraba dentro de la bolsa de diálisis y se colocó dentro de un tubo eppendorf. La bolsa de diálisis se enjuagó con 100 μ l de TE y estos se colocaron en el tubo eppendorf.

4. Se extrajo el cDNA con un volumen de fenol-cloroformo, se centrifugó a 12,000 rpm por 10 minutos y se tomó la fase acuosa. Se precipitó el cDNA con 2.5 volúmenes de etanol + 0.1 volúmenes de acetato de sodio 3 M a -20° C por 12 horas.

5. Se centrifugó a 12,000 rpm a 4° C por 30 minutos, se desechó el sobrenadante y se lavó la pastilla con etanol al 80 %. Se centrifugó a 12,000 rpm a 4° C por 10 minutos y se desechó el sobrenadante.

6. Se redisolvió la pastilla en 20 μ l de TE.

7.2.5 Obtención de las sondas.

Se llevaron a cabo los métodos descritos anteriormente con el objetivo de obtener los fragmentos de los genes *c-fos*, *c-jun* y *p53* los cuales se usaron como sondas en las hibridaciones Southern blot. Se llevó a cabo la transformación de bacterias competentes *E. coli* DH 5 α con los plásmidos que contenían el DNA complementario (cDNA) de *c-fos*, *c-jun* y *p53*. El cDNA de *c-fos* de humano estaba inserto en el plásmido pSP65 (Van Straaten *et al.*, 1983), el cDNA de *c-jun* humano en el plásmido pUC18 y el cDNA de *p53* de ratón en el plásmido pGEM-1 (Schmiegl

y Simmons, 1988). Posteriormente se llevó a cabo la amplificación, digestión enzimática y purificación de los cDNAs.

La Figura 6 muestra el fragmento de p53 que se usó como sonda. El primer carril corresponde al DNA del fago λ digerido con Hind III, el cual se usa como marcador de peso molecular. En el segundo carril se observa el DNA del plásmido, sin digerir, de pGEM-1 el cual tiene inserto el cDNA de p53 (pGEM-1/p53). El tercer carril corresponde al fragmento de p53 purificado y el cuarto carril al DNA del plásmido pGEM-1 purificado. El quinto carril corresponde al plásmido pGEM-1/p53 digerido con Bam H I. El fragmento de 2.1 kb corresponde al cDNA de p53 y el fragmento de 2.9 kb al DNA de pGEM-1.

La Figura 7 muestra el fragmento de *c-fos* usado como sonda. En el primer carril se observa el DNA del fago λ digerido con Hind III. En el segundo carril se presenta el DNA del plásmido, sin digerir, de pSP65 el cual contiene inserto el cDNA de *c-fos* (pSP65/*c-fos*). En los carriles 3 al 10 se observa el DNA del plásmido pSP65/*c-fos* digerido con Eco R I + Pst I. El fragmento de 615 pb se purificó por electroelución y es el que se utilizó como sonda. En el carril 11 se observa una escalera de DNA de 100 pb, la cual sirve como marcador de peso molecular.

En la Figura 8 se muestra el fragmento de *c-jun* usado como sonda. El DNA del fago λ digerido con Hind III se usó como marcador de peso molecular (carril 1). En el carril 2 se observa el DNA de pUC18/*c-jun* digerido con Hind III + Pst I. El fragmento de 900 pb corresponde al fragmento de *c-jun* utilizado como sonda y el fragmento de 4.4 kb al DNA de pUC18. En el tercer carril se observa el DNA de pUC18/*c-jun* sin digerir. El fragmento de *c-jun* se purificó por electroelución para usarlo como sonda.

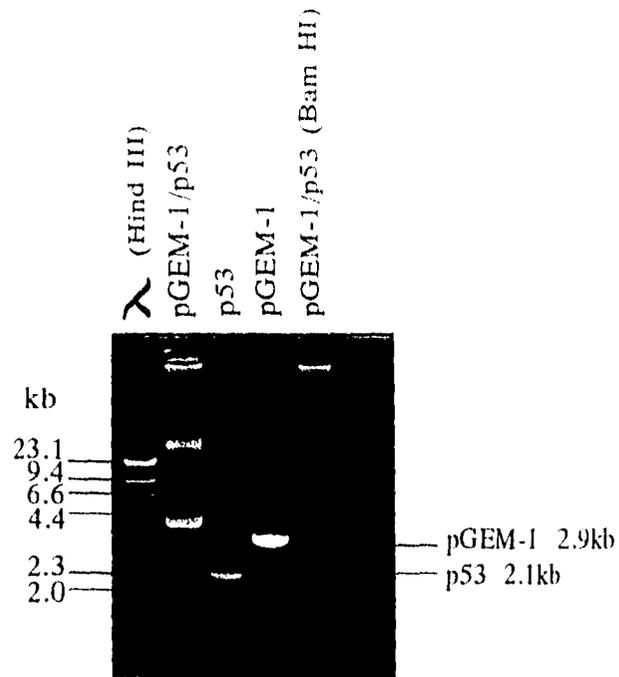


Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa al 1% en la cual se muestra la obtención del fragmento de p53 de 2.1 kb, el cual fue usado como sonda en las hibridaciones Southern blot.

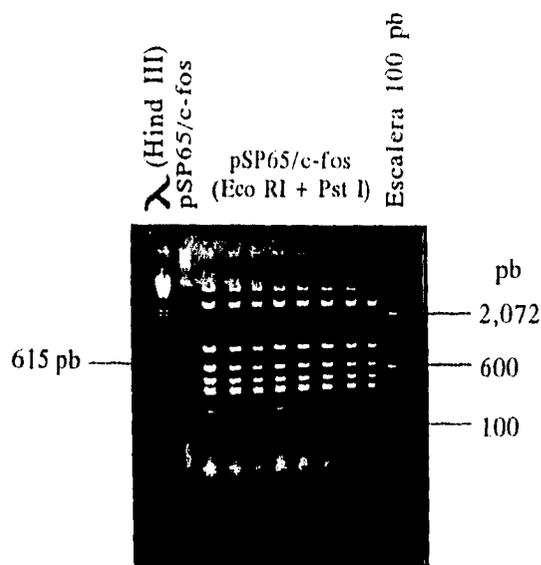


Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa al 1% en la cual se muestra la obtención del fragmento de *c-fos* de 615 pb, el cual fue usado como sonda en las hibridaciones Southern blot.

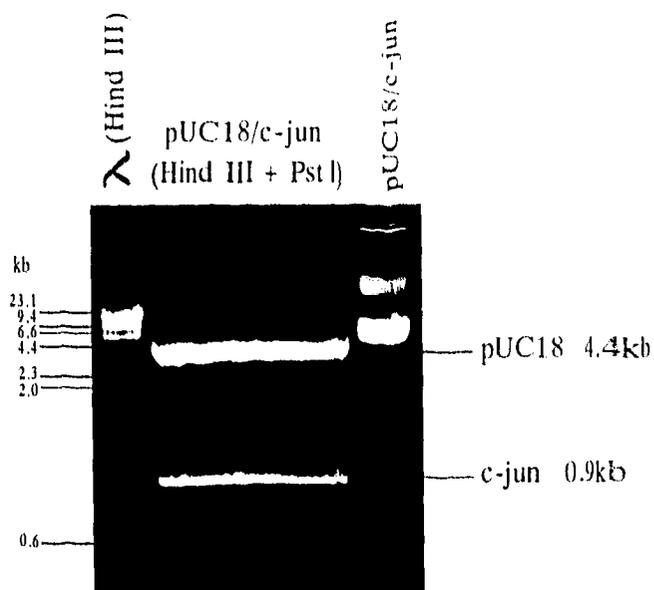


Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa al 1% en la cual se muestra la obtención del fragmento de *c-jun* de 900 pb, el cual fue usado como sonda en las hibridaciones Southern blot.

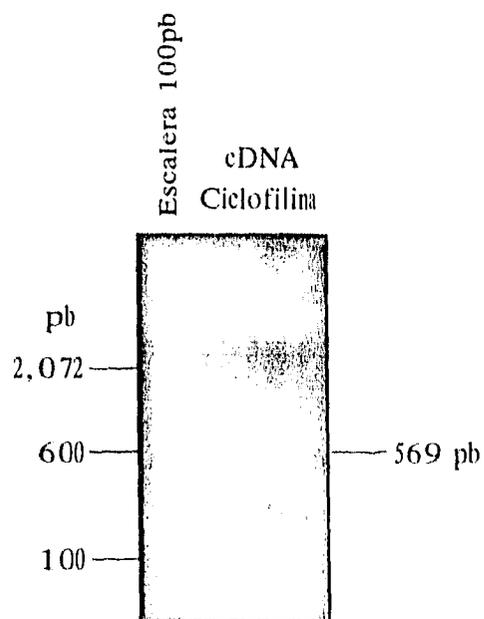


Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa al 1% en la cual se muestra la obtención del fragmento de ciclofilina de 569 pb, el cual fue usado como sonda en las hibridaciones Southern blot.

La sonda de ciclofilina que se utilizó en las hibridaciones "Southern blot" fue preparada por medio de RT-PCR, a partir de RNA total de útero y páncreas de rata, usando los oligos que se describen posteriormente (Síntesis de oligonucleótidos). El producto obtenido se corrió en un gel de agarosa (Figura 9). En el primer carril se observa una escalera de DNA de 100 pb y en los carriles 2 y 3 el producto del RT-PCR. El fragmento de 569 pb se purificó por electroelución para usarlo como sonda.

7.2.6 Animales de experimentación.

A lo largo de este estudio se utilizaron ratas adultas de la cepa Long-Evans de 200-250 g, que fueron mantenidas en un ciclo luz:oscuridad 14:10, con agua y comida *ad libitum*.

Para el modelo farmacológico se ovariectomizaron ratas bajo anestesia total con ketamina. Diez días después de la cirugía las ratas fueron tratadas, por vía intraperitoneal, con vehículo (90 % solución salina, 10 % etanol) ó con 17 β -estradiol (5 μ g/100 g de peso corporal) disuelto en 0.15 ml de vehículo. Las ratas se mataron por decapitación a diferentes tiempos después de la administración de estradiol (1, 2, 3 y 6 h), se disectó el útero y se procesó inmediatamente para extraer el RNA total.

Para el modelo fisiológico, se utilizaron ratas que presentaron por lo menos 4 ciclos estrales regulares de 4 días de duración, los cuales fueron determinados por medio del análisis microscopio de frotis vaginales diarios. Se mataron ratas a las 11:00 h del proestro, estro, metaestro y diestro y a las 9:00, 11:00, 13:00, 15:00, 17:00 y 19:00 h del proestro. Inmediatamente después de matar al animal se disectó el útero y se procesó para extraer el RNA total.

7.2.7 Extracción de RNA total.

El RNA total se extrajo de los úteros provenientes de los diferentes grupos de ratas en estudio, de la siguiente manera:

1. En tubos nuevos y estériles se homogenizaron, con un politrón, 100 mg de tejido con 1 ml de TRIzol a 4° C.
2. Se transfirieron las muestras homogenadas a tubos eppendorf de 1.5 ml y se agregaron 200 µl de cloroformo por 1 ml de homogenado. Se taparon los tubos y se agitaron con vortex por 30 seg.
3. Los tubos se mantuvieron en hielo por 5 minutos y se centrifugaron a 12,000 rpm a 4° C por 15 minutos. Al final se obtuvieron dos fases: la inferior de color rojo compuesta por fenol:cloroformo y la porción superior acuosa incolora. El RNA quedó en esta última fase, mientras que el DNA y las proteínas se mantienen en la interfase y en la fase orgánica.
4. Se transfirió la fase acuosa a otro tubo eppendorf y se agregó un volumen igual de isopropanol. La muestra se mantuvo a 4° C durante toda la noche.
5. Se centrifugaron las muestras por 15 minutos a 12,000 rpm a 4° C. El RNA se precipitó formando una pastilla blanca amarillenta.
6. Se removió el sobrenadante y se lavó la pastilla con etanol al 80%. Se centrifugó a 7,500 rpm durante 8 minutos a 4° C.
7. Se removió el sobrenadante y se colocaron los tubos en sentido inverso sobre una gasa estéril y se secó la pastilla en un horno con vacío a temperatura ambiente sin que se secase por completo la pastilla para evitar la insolubilidad de la misma.

8. Se disolvió la pastilla de RNA en 50 µl de H₂O-DEPC. Se hicieron diluciones 1:100 y se leyó la absorbancia de estas muestras a las siguientes longitudes de onda : 260, 280 y 310 nm. Se determinó la concentración de RNA mediante la siguiente fórmula: 1 unidad de Absorbancia a 260 nm = 40 µg de RNA /ml. También se determinó la pureza del RNA por medio de la relación de absorbancias obtenida a 260 y 280 nm (260/280 nm).

7.2.8 Electroforesis del RNA.

1. Se preparó un gel desnaturalizante de agarosa al 1% de la siguiente manera:

	Concentración final	Cantidad necesaria para preparar 120 ml de gel
Agarosa	1 %	1.2 g
Formaldehído 37%	6 %	19 ml
MOPS 12X	1 X	10 ml
Agua estéril/DEPC	----	91 ml

La agarosa se disolvió en el agua tratada con DEPC. Posteriormente se agregaron el formaldehído y el MOPS, se mezcló la solución y se vertió en el molde de la cámara de electroforesis.

2. Para el corrimiento electroforético se prepararon las muestras de la siguiente manera:

	Concentración final.
RNA	3 µg
Formamida	50 %
Formaldehído	6.5 %
MOPS	1 X
Amortiguador Loading para RNA	1 X
Bromuro de Etidio	2.5 µg

El RNA se mezcló con la formamida, el formaldehído y el MOPS y se calentó a 75° C por 5 minutos, se colocó inmediatamente en hielo por 5 minutos. Se le agregó el amortiguador Loading y el bromuro de etidio.

3. Se cargaron las muestras en el gel y se corrieron a 90 volts por 120 minutos. Se observaron las muestras en un transiluminador de luz ultravioleta.

7.2.9 Síntesis de oligonucleótidos.

Los oligonucleótidos utilizados para detectar la expresión de los genes *c-fos*, *c-jun*, *p53* y ciclofilina fueron sintetizados y purificados en el Laboratorio de Hormonas y Reproducción del Hospital de Bicêtre, Francia. La secuencia de éstos se presenta en la tabla 3.

Los oligonucleótidos delimitan un fragmento de 247 pb del cDNA de *c-fos* de rata que abarca de +258 a +505 (Curran *et al.*, 1987), un fragmento de 389 pb del cDNA de *p53* de rata que abarca de +718 a +1107 (Soussi *et al.*, 1988), un fragmento de 571 pb del cDNA de ciclofilina de humano que abarca de +51 a +622 (Haendler *et al.*, 1987), todos relativos al sitio de inicio de la traducción, y un fragmento de 325 pb del cDNA de *c-jun* de rata que abarca de +1565 a +1890 con respecto al sitio de inicio de la transcripción (Kitabayashi *et al.*, 1990).

TABLA 3. Secuencia de los oligonucleotidos usados para el PCR.

	Oligo sentido	Oligo antisentido
<i>c-fos</i>	5'-CCCCTGTCAACACACAGGAC-3'	5'-CCGATGCTCTGCGCTCTGC-3'
<i>c-jun</i>	5'-CAGATCCCGGTGCAGCACCCG-3'	5'-GTTGGCACCCACTGTTAACGTGG-3'
<i>p53</i>	5'-GCATGGGGGGCATGAACCGCCG-3'	5'-GGTCTTCGGGTAGCTGGAGTGAGC-3'
ciclofilina	5'-CCGCGTCTCCTTTGAGCTGTTT-3'	5'-ACCCAAAGGGAAGTGCAGCGAGAG-3'

7.2.10 Retrotranscripción del RNA (RT)

Se realizó la retrotranscripción del RNA total para obtener el DNA complementario (cDNA). Para esto se preparó la siguiente mezcla para una reacción:

	Concentración final
RNA total	2 µg
Buffer RT	1X: 50 mM Tris-HCl (pH 8.3) 75 mM KCl 3 mM MgCl ₂
DTT	10 mM
dNTPs	0.5 mM de cada dNTP
RT M-MLV	400 unidades
Oligo (dT) ₁₂₋₁₈ primers	0.05 µg
H ₂ O	cbp 10 µl

Se mezclaron todos los reactivos en un tubo eppendorf y se incubó a 37° C por una hora. El control negativo consistió de una muestra de agua en sustitución del RNA.

7.2.11 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Se amplificaron por medio de la técnica de PCR un fragmento de los genes de *c-fos*, *c-jun*, *p53* y ciclofilina. Para esto se preparó la siguiente mezcla para una reacción:

	Concentración final
Buffer PCR	1X: 20 mM Tris-HCl (pH 8.4) 50 mM KCl
MgCl ₂	1 mM
dNTPs	0.2 mM de cada dNTP
Oligo Sentido	0.5 μM
Oligo Antisentido	0.5 μM
TAQ DNA polimerasa	2.5 unidades
H ₂ O	cbp 40 μl

A 10 μl de reacción de RT se le agregó los 40 μl de la mezcla de PCR. La reacción se llevó a cabo en un termociclador Perkin Elmer Cetus Modelo 9600. Se realizó un ciclo inicial de desnaturalización a 95° C por 5 minutos, seguido por 25 ciclos de reacción con el siguiente perfil: 1 minuto de desnaturalización a 95° C, 1 minuto de hibridación de los oligos iniciadores a 50° C y 1 minuto de extensión a 72° C. Al finalizar los 25 ciclos se realizó un ciclo de extensión a 72° C por 5 minutos. Se realizaron 25 ciclos para asegurarnos de estar en la fase exponencial de la amplificación.

7.2.12 Electroforesis de los productos de RT-PCR

Una vez que se realizó el RT-PCR, se corrió una electroforesis de los productos obtenidos. Para ello se preparó un gel de agarosa al 1% y se corrieron 10 μl de producto de RT-PCR.

1. Se prepararon 120 ml de gel, se pesó 1.2 g de agarosa y se le agregó 120 ml de TBE 0.5 X y 6 μl de bromuro de etidio (.10 mg/ml) (0.5 μg/ml concentración final).

2. A 10 μ l de producto del RT-PCR se le agregó 2 μ l de Amortiguador Loading para DNA 6X y la mezcla se cargó en el gel. El gel se corrió a 90 volts por 1 hora y media en amortiguador TBE 0.5 X .

3. Se desnaturalizó el gel en una solución 0.5 N de NaOH + 1.5 M de NaCl por 45 minutos en movimiento constante. Después se enjuagó el gel con agua estéril por un par de minutos y se neutralizó con una solución Tris-HCl 1 M (pH 7.4) + 1.5 M de NaCl por 45 minutos con movimiento constante.

7.2.13 Transferencia a filtros de nylon.

1. Se enjuagó el gel con agua estéril varias veces. Se cortó un pedazo de membrana de Nylon (Gene Screen) y dos de papel Whatman 3 MM del mismo tamaño que el gel. Se colocaron 1 minuto en agua estéril y 10 minutos en SSC 10 X .

2. Se colocó un pedazo de papel Whatman 3 MM sobre un soporte más ancho y largo que el gel, se colocó dentro de un recipiente y se llenó este último con SSC 10 X. Cuando el papel Whatman que se encontraba sobre el soporte se mojó completamente, se eliminaron las burbujas de aire con una varilla de vidrio.

3. Se colocó el gel sobre el soporte en posición invertida y se eliminaron las burbujas entre el gel y el papel Whatman con una varilla de vidrio. Se cortó la esquina superior izquierda del gel para señalar el primer carril.

4. Se colocó la membrana de Nylon sobre el gel y se le cortó la misma esquina que al gel. Se eliminaron las burbujas de aire entre la membrana y el gel y se colocaron, sobre la membrana, dos pedazos de papel Whatman y se eliminó el aire con una varilla de vidrio.

5. Se cortaron toallas de papel del mismo tamaño que el gel y se colocaron encima del papel Whatman hasta alcanzar una altura de 8 a 10 centímetros. Se colocó un soporte de vidrio encima de las toallas de papel y encima del vidrio una pesa de 500 g.

6. Se transfirieron por capilaridad los productos de RT-PCR durante 18 horas. Al pasar este tiempo se quitaron las toallas y el papel Whatman. Se marcaron los pozos del gel en la membrana con un lápiz .

7. La membrana se retiró del gel y se eliminó el exceso de sales sumergiéndola en SSC 6 X a temperatura ambiente durante unos segundos. Se colocó la membrana sobre papel Whatman y se dejó secar a temperatura ambiente durante 30 minutos.

8. Se colocó la membrana entre dos pedazos de papel Whatman y se calentó durante 2 horas a 80° C en un horno con vacío para fijar los productos de RT-PCR a la membrana.

7.2.14 Hibridación Southern Blot

1. Se preparó la solución de prehibridación el mismo día que se llevó a cabo la prehibridación. Esta solución está constituida por:

	Concentración final
Formamida	40%
SDS	0.2%
EDTA (pH 8)	10 mM
Reactivo Denhardt	4X
PB (pH 6.5)	120 mM
DNA esperma de salmón	100 µg/ml
SSC	2X

Se prepararon 0.2 ml por cada cm² de membrana que se hibridó.

El DNA de esperma de salmón se disolvió en 1 ml de agua estéril tratada con DEPC y se calentó a 100° C por 5 minutos. En seguida se colocó en hielo por 5 minutos y posteriormente se le agregó a la mezcla.

2. Se colocó la membrana de nylon dentro de una bolsa de hibridación. Se añadió la solución de prehibridación dentro de la bolsa y se eliminó todo el aire. Se selló la bolsa y se colocó en un baño de agua con agitación a 42° C y se dejó prehibridando 18 horas.

3. Se marcaron los cDNA de *c-fos*, *c-jun* y p53 y el producto de PCR del gen de ciclofilina con [α -³²P] dCTP por medio del método de "Iniciadores Aleatorios" (Sambrook *et al.*, 1989). Para ello se preparó la siguiente mezcla:

cDNA	100 ng
Buffer de iniciadores aleatorios	15 μ l
dATP	2 μ l
dGTP	2 μ l
dTTP	2 μ l
[α - ³² P] dCTP	5 μ l
Fragmento Klenow de la DNA polimerasa	1 μ l
H ₂ O	cbp 50 μ l

4. Se mezcló el cDNA con el agua y se desnaturalizó a 100° C por 5 minutos. Se sacó e inmediatamente se colocó en hielo otros 5 minutos. Se le agregó el buffer de iniciadores aleatorios, el dATP, dGTP y el dTTP.

5. En la campana y detrás de una pantalla de acrílico se le agregó el [α -³²P] dCTP y se mezcló con la punta de la pipeta. Se agregó el fragmento Klenow de la DNA polimerasa y se mezcló con la punta de la pipeta. Se dejó incubar la mezcla 2 horas a temperatura

ambiente dentro de un blindaje de plomo en la campana detrás de la pantalla de acrílico.

6. Media hora antes de que terminara la incubación se prepararon unas columnas de Sephadex G-50 para separar el [α - 32 P] dCTP no incorporado. Para esto se colocó en el fondo de una jeringa de insulina un poco de fibra de vidrio estéril y después se llenó la jeringa con el Sephadex usando una pipeta Pasteur estéril. Se centrifugaron las columnas a 1,500 rpm por 3 minutos a 4° C.

7. Dentro de un tubo de centrifuga se colocó un tubo eppendorf sin tapa y rotulado. Dentro de este mismo tubo se colocó la columna de Sephadex.

8. Transcurridas 2 horas, se agregaron a la mezcla, en la campana y detrás de la pantalla de acrílico, 5 μ l de amortiguador de inactivación del fragmento Klenow (Na_2EDTA 0.2 M pH 7.5) y 100 μ l de TE (pH 8) y se mezcló.

9. Se colocaron los 155 μ l de mezcla dentro de la columna de Sephadex y se centrifugaron a 1,500 rpm por 3 minutos a 4° C. Se comprobó con el contador Geiger, detrás de la pantalla de acrílico, la cantidad de radioactividad que se quedó en la columna y la que se incorporó a las sondas. El porcentaje de incorporación en todos los casos fué por lo menos del 50%.

10. Con unas pinzas se sacó el tubo eppendorf del tubo de centrifuga y se tapó. Se hirvió la sonda por 5 minutos, después de los cuales se enfrió en hielo 5 minutos.

11. Se sacó la membrana de nylon del baño de agua y se le hizo un pequeño corte a la bolsa por el cual se sacó la mitad del amortiguador de hibridación. Se sacó el aire que se pudo haber formado dentro de la bolsa.

12. Con una pipeta Gilson se metió dentro de la bolsa la sonda marcada. Se selló la bolsa y se colocó dentro de una caja de acrílico con tapa. Se metió la caja de acrílico en un baño de agua y se dejó hibridando a 40° C por 24 horas.

13. Transcurrido el tiempo, la hibridación se sacó del baño de agua. En la campana y detrás de la pantalla de acrílico se abrió la bolsa por una esquina. Se vació el amortiguador de prehibridación con la sonda dentro de un tubo Falcon. El tubo se colocó en un blindaje de plomo y se guardó en el congelador ya que puede ser reutilizada en otra hibridación.

14. Se colocó dentro de la bolsa 10 ml de solución SSC 2X y se lavó la membrana. Se desechó esta solución en el bote para desechos radioactivos. Se abrió la bolsa y se colocó la membrana en un recipiente con SSC 2X. Se agitó durante media hora a temperatura ambiente. Se cambió la solución por una nueva de SSC 2X y se dejó agitando 30 minutos como en el paso anterior.

15. Se cambió la solución por otra de SSC 0.1X + SDS 0.1%. Se colocó el recipiente en un baño de agua a 50° C y se lavó por media hora. Se sacó la membrana y se verificó con el contador Geiger la radiactividad.

16. Se colocó la membrana dentro de una bolsa de plástico y se selló la bolsa. Se expusieron las membranas a una película X-OMAT (Kodak) por diferentes tiempos y se revelaron.

7.2.15 Análisis densitométrico.

Las autoradiografías que se obtuvieron se cuantificaron por densitometría en un espectrofotómetro DU 600 de Beckman; se usaron las autoradiografías que tenían el menor tiempo de exposición. Las autoradiografías se colocaron en el adaptador para

geles y películas y este se colocó dentro del espectrofotómetro. Se calibró a cero con una parte de la misma placa que no estaba expuesta a radiación. Las muestras se leyeron a 420 nm y se obtuvieron las lecturas de absorbancia de cada muestra.

7.2.16 *Análisis estadístico.*

Todos los experimentos se realizaron por duplicado y los datos fueron analizados mediante un análisis de varianza de una sola vía (ANOVA) seguida por la prueba T de Student de diferencias individuales entre medias. El programa estadístico EPISTAT fue usado para calcular los valores de probabilidad.

RESULTADOS

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

8.1 INDUCCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE *c-fos*, *c-jun* Y p35 POR 17 β -ESTRADIOL EN EL ÚTERO DE RATAS OVARIECTOMIZADAS.

Con el objetivo de determinar el efecto que tiene el estradiol sobre la regulación de la expresión de p53, *c-fos* y *c-jun* se ovariectomizaron ratas adultas de la cepa Long-Evans bajo anestesia total con ketamina diez días antes de ser tratadas con 17 β -estradiol (5 μ g/100 g de peso corporal) o con vehículo (90 % solución salina, 10 % etanol). Las ratas se mataron a diferentes tiempos después del tratamiento (1, 2, 3 y 6 horas) e inmediatamente después se disectó el útero. Este fue procesado por medio de la técnica del isotiocianato de guanidina/ fenol/ cloroformo para obtener el RNA total. Se determinó la concentración y la pureza de los RNAs obtenidos por medio de la lectura de la absorbancia a 260 y 280 nm de diluciones 1:100. En todas las muestras la relación 260/280 fue mayor a 1.8, lo cual indica que los RNAs obtenidos se encuentran puros. Posteriormente se realizó una electroforesis en un gel desnaturizante de agarosa para observar la integridad de los RNAs.

La Figura 10 muestra la electroforesis de los RNAs obtenidos del útero de ratas tratadas con vehículo (V) o con 17 β -estradiol por 1, 2, 3 y 6 horas. En ella se observa los RNAs ribosomales 28s y 18s (los cuales están presentes en aproximadamente la misma proporción) y no se observa material degradado, todo lo cual nos indica que el RNA obtenido se encuentra íntegro.

A partir de los RNAs obtenidos se realizó el RT-PCR para amplificar la señal del RNA mensajero (mRNA) de *c-fos*, *c-jun*, p53 y ciclofilina (la cual fue usada como gen de expresión constitutiva). En un gel de agarosa al 1% se corrieron 10 μ l del producto del RT-PCR y se observaron en un transiluminador (Figuras 11 y 12). En la Figura 11 se observa el producto del RT-PCR de *c-fos* (228 pb) y el de *c-jun*

(324 pb) y en la Figura 12 se observa el producto del RT-PCR de p53 (389 pb) y el de ciclofilina (569 pb) de las muestras de útero de ratas tratadas con vehículo (V) o con 17β -estradiol por 1, 2, 3 y 6 horas. Los fragmentos que se obtuvieron fueron del tamaño que se esperaban.

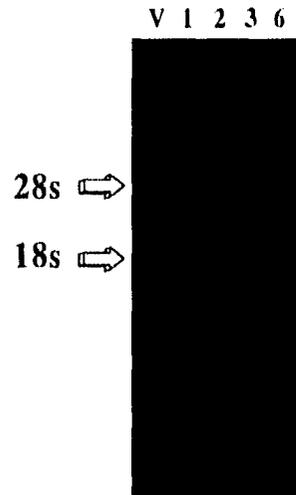


Figura 10. Electroforesis en gel desnaturizante de agarosa en el cual se muestran los RNAs de útero de ratas ovariectomizadas tratadas con vehículo (V) o con 17β -estradiol por 1, 2, 3 o 6 horas. 28s y 18s = RNAs ribosomales.

Los geles se desnaturalizaron, se neutralizaron y se transfirieron a una membrana de nylon, en la cual se fijaron por medio de calor. Las membranas se prehibridaron y posteriormente se hibridaron con las sondas de *c-fos*, *c-jun*, p53 y ciclofilina, las cuales se habían marcado con ^{32}P por el método de "iniciadores aleatorios". Los resultados de las hibridaciones se obtuvieron por medio de autoradiografías (Figura 13) y se cuantificaron por medio de densitometria (Figura 14A). La expresión relativa se obtuvo al corregir la expresión de los genes estudiados con la de ciclofilina. El estradiol indujo la expresión de los tres genes estudiados comparado respecto al vehículo (Figura 13 y 14A). La máxima inducción de *c-fos* y *c-jun* (5.7-veces respecto al vehículo) se observó 1 hora después del

tratamiento con estradiol. En las siguientes horas se observó un decremento en los niveles del mRNA de estos genes, y regresó a niveles basales 6 horas después del tratamiento (Figura 14A). El gen supresor de tumores p53 presentó un patrón de expresión muy similar al de *c-fos* y *c-jun* después de administrar estradiol a las ratas, sin embargo, la máxima inducción de su expresión fue menor (2.3-veces respecto al vehículo) que la de *c-fos* y *c-jun* (Figura 14A).

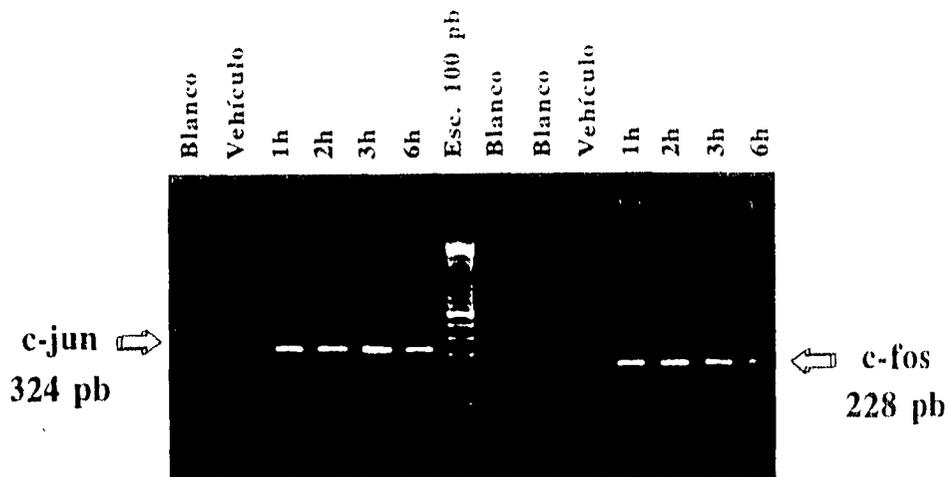


Figura 11. Electroforesis de los productos de RT-PCR de *c-fos* y *c-jun*. El RT-PCR fue realizado a partir de RNA total de útero de ratas ovariectomizadas tratadas con vehículo o con 17β -estradiol por 1, 2, 3 y 6 horas. Se usó una escalera de DNA de 100 pb como marcador de peso molecular (Esc. 100 pb).

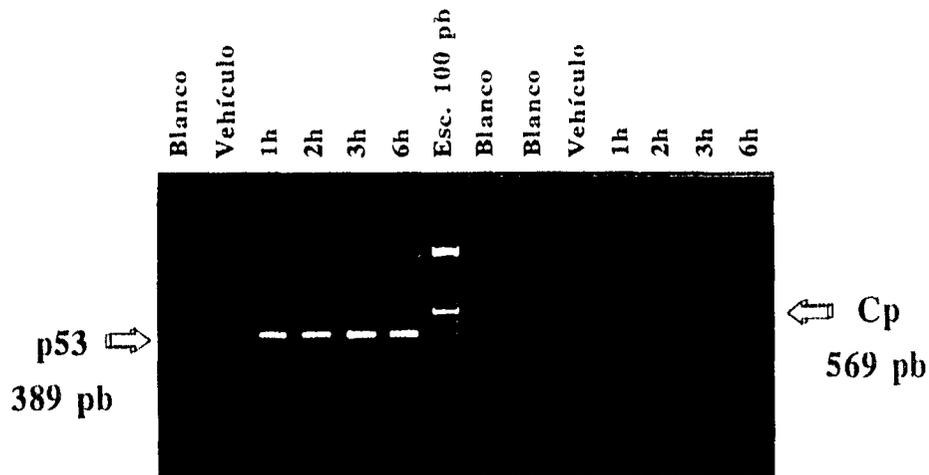


Figura 12. Electroforesis de los productos de RT-PCR de p53 y ciclofilina (Cp). El RT-PCR fue realizado a partir de RNA total de útero de ratas ovariectomizadas tratadas con vehículo o con 17β -estradiol como se describe en la figura 11.

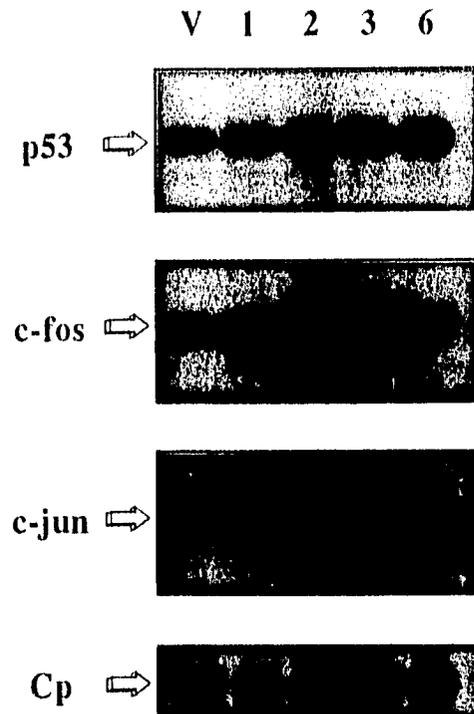


Figura 13. Inducción de la expresión de p53, c-fos y c-jun por E₂. Southern Blot de los productos de RT-PCR preparados a partir de RNA total de útero de ratas ovariectomizadas tratadas con vehículo (90% solución salina, 10% etanol) (V) o 17β-estradiol por 1, 2, 3 y 6 horas. El gen de la ciclofilina (Cp) se usó como un gen de expresión constitutiva.

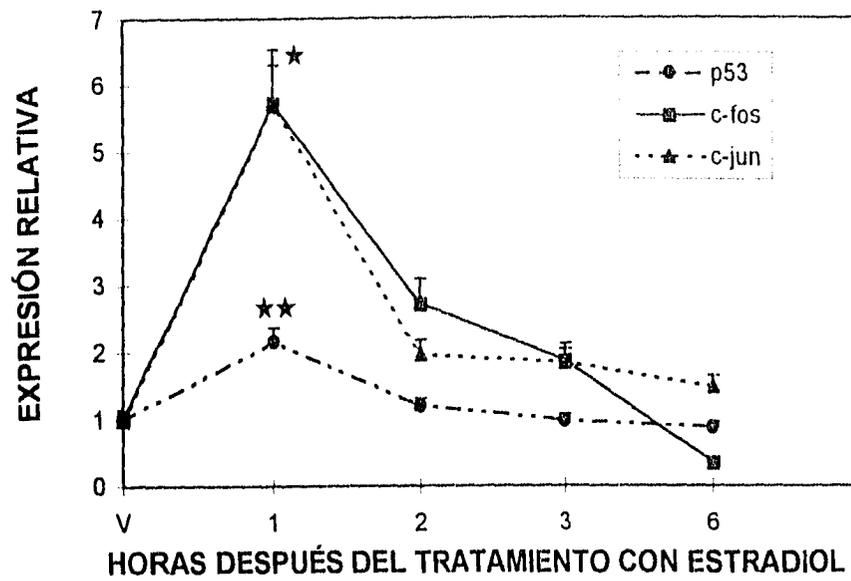


Figura 14A. Regulación de la expresión de los genes p53, c-fos y c-jun por 17 β -estradiol. Los resultados se presentan como los datos densitométricos de las autorradiografías. La expresión relativa se obtuvo al corregir la expresión de los genes estudiados con la de ciclofilina (Cp), el cual es usado como un gen de expresión constitutiva. Los valores representan la media \pm E.S.M. * $P < 0.01$ vs V, 2, 3 y 6; ** $P < 0.05$ vs V, 2, 3 y 6.

En la gráfica 14B se presenta la expresión de cada gen estudiado corregida con el valor promedio de ciclofilina. Se observa, al igual que en la gráfica 14A, que la expresión de los tres genes estudiados es inducida por el estradiol 1 hora después de su administración y esta disminuye en las siguientes horas.

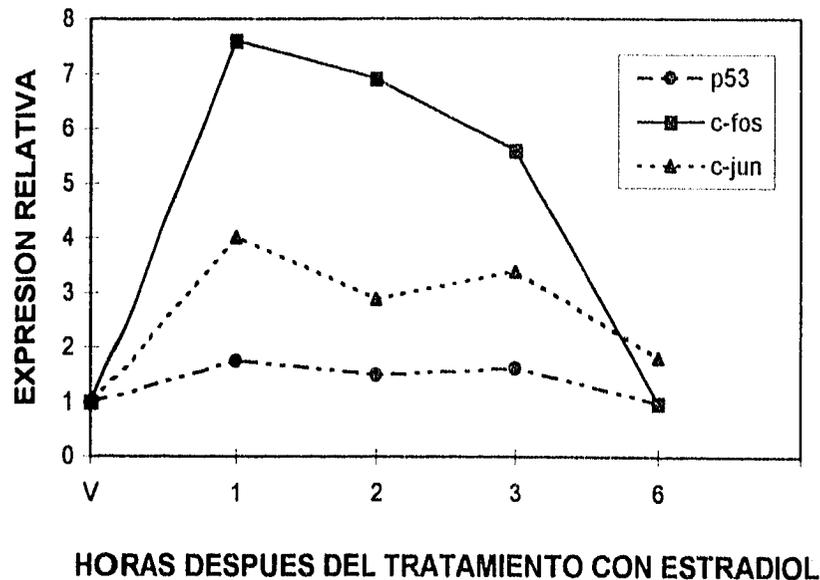


Figura 14B. Regulación de la expresión de los genes p53, c-fos y c-jun por 17 β -estradiol. Los resultados se presentan como los datos densitométricos de las autorradiografías. La expresión relativa se obtuvo al corregir la expresión de los genes estudiados con la del promedio de ciclofilina, el cual es usado como un gen de expresión constitutiva.

8.2 VARIACIONES EN LA EXPRESIÓN DE *c-fos*, *c-jun* Y p53 EN EL ÚTERO DE LA RATA DURANTE EL CICLO ESTRAL.

Para el modelo fisiológico se utilizaron ratas que presentaron por lo menos 4 ciclos estrales regulares de 4 días de duración, los cuales fueron determinados por medio del análisis microscópico de frotis vaginales diarios. Se sacrificaron los animales a las 11:00 h. del proestro, estro, metaestro y diestro y a las 09:00, 11:00, 13:00, 15:00, 17:00 y 19:00 h. del proestro. Inmediatamente después de matar al animal se disectó el útero y se extrajo el RNA total como se describió anteriormente. Se llevaron a cabo las reacciones de RT-PCR a partir del RNA total, se separaron en un gel de agarosa, se desnaturalizó y neutralizó el gel y los productos del RT-PCR se transfirieron a una membrana de nylon. Las membranas se hibridaron con las sondas, marcadas con ^{32}P , de *c-fos*, *c-jun*, p53 y ciclofilina. Los resultados de la hibridación se obtuvieron por medio de autoradiografías (Figura 15) y se cuantificaron por medio de densitometría (Figuras 16A y 17).

La expresión de *c-fos* fue muy similar a las 11:00 h del metaestro (7.35 veces), diestro (5.92 veces) y proestro (6.2 veces), mientras que a las 11:00 h del estro se observó un marcado incremento (12.5 veces) (Figura 16A). La expresión de p53 presentó un comportamiento similar al de *c-fos* a las 11:00 h del día del metaestro (7.29 veces) y diestro (5.8 veces), sin embargo, se detectó una disminución importante a las 11:00 h del día del proestro (2.42 veces) y el estro (3.44 veces), cuando *c-fos* alcanzó su máximo valor (Figura 16A). A diferencia de los cambios observados tanto en *c-fos* como en p53, la expresión de *c-jun* fue menor y se mantuvo prácticamente constante (1.4 a 2.39 veces) durante el ciclo estral (Figura 16A).

Por medio de estudios Northern blot se observó este mismo patrón de expresión de los tres genes estudiados durante el ciclo estral (datos no mostrados).

Para correlacionar de una manera más precisa los cambios en la concentración sérica de estradiol con la expresión de los genes estudiados se determinaron los niveles de mRNA de *c-fos*, *c-jun* y p53 durante el día del proestro, cada dos horas, desde las 09:00 h hasta las 19:00 h. Todos los genes estudiados presentaron su máxima expresión a las 09:00 h (*c-fos* 13.97 veces, p53 3.74 veces y *c-jun* 2.3 veces) (Figura 17). Es importante notar que el gen de *c-fos* presentó la más alta expresión de los genes estudiados, y esta es mayor que la que presentó a las 11:00 h del estro (12.5 veces). Este incremento en los niveles del mRNA de los genes estudiados es seguido por una importante disminución en las siguientes cuatro horas (*c-fos* 2.97 veces, p53 1.33 veces y *c-jun* 0.45 veces). Sin embargo, a las 15:00 h se observó, en todos los genes estudiados, un pequeño incremento (*c-fos* 6.2 veces, p53 2.13 veces y *c-jun* 0.94 veces), seguido otra vez por una disminución en las siguientes cuatro horas (*c-fos* 3.06 veces, p53 0.91 veces y *c-jun* 0.71 veces) (Figura 17).

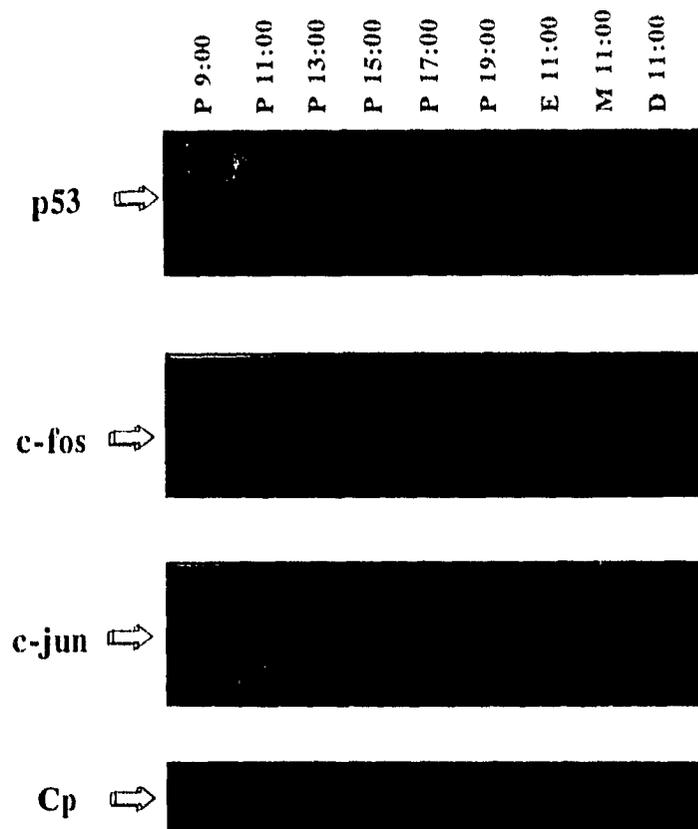


Figura 15. Expresión de los genes p53, c-fos y c-jun durante el ciclo estral. Southern Blot de los productos de RT-PCR preparados a partir de RNA total de útero de ratas durante los diferentes días del ciclo estral. Las ratas fueron sacrificadas a las 9:00, 11:00, 13:00, 15:00, 17:00 y 19:00 horas del proestro (P) y a las 11:00 horas de los días del estro (E), metaestro (M) y diestro (D). El gen de la ciclofilina (Cp) se usó como un gen de expresión constitutiva.

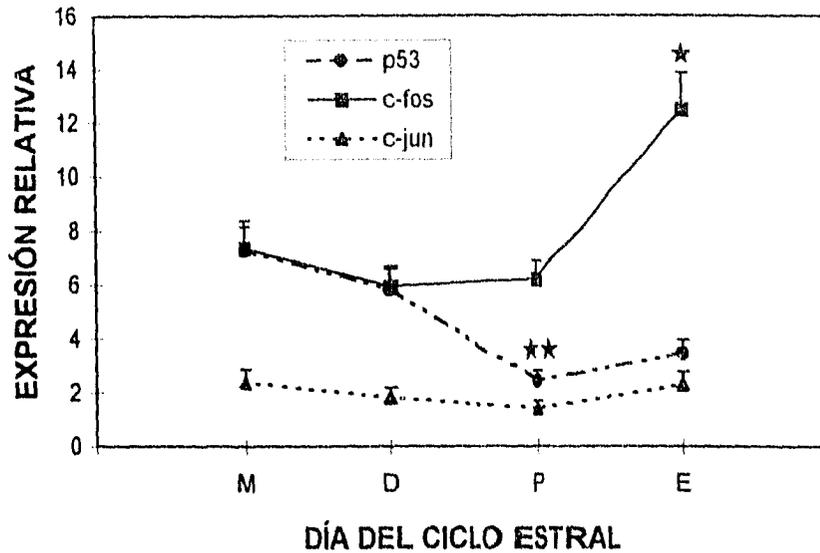


Figura 16A. Expresión de los genes p53, c-fos y c-jun durante el ciclo estral. Se preparó RNA total de animales sacrificados a las 11:00 horas del día del metaestro (M), diestro (D), proestro (P) y estro (E). Los resultados se presentan como los datos densitométricos de las autoradiografías. La expresión relativa se obtuvo al corregir la expresión de los genes estudiados con la de ciclofilina como se describió previamente. Los valores representan la media \pm E.S.M. * $P < 0.01$ vs M, D y P; ** $P < 0.05$ vs M y D.

En la gráfica 16B se presenta la expresión de cada gen estudiado corregida con el valor promedio de ciclofilina. Así mismo, el valor de expresión relativa de cada gen obtenido en el metaestro se le asignó el valor de 1 y el valor de los siguientes días se expresó respecto a este valor. Se observó, al igual que en la gráfica 16A, que la expresión de *c-fos* se mantiene prácticamente constante durante el metaestro y diestro y es inducida durante el proestro y estro. *p53* presenta su máxima expresión durante el metaestro y disminuye en los otros días del ciclo. La expresión de *c-jun* se mantiene prácticamente constante durante los cuatro días del ciclo.

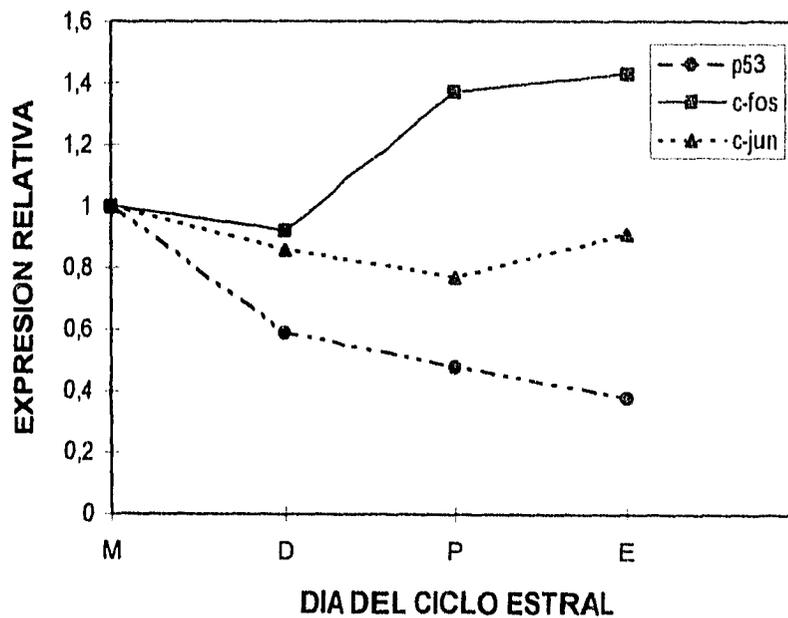


Figura 16B. Expresión de los genes p53, c-fos y c-jun durante el ciclo estral. Se preparó RNA total de animales sacrificados a las 11:00 horas del día del metaestro (M), diestro (D), proestro (P) y estro (E). Los resultados se presentan como los datos densitométricos de las autorradiografías. La expresión relativa se obtuvo al corregir la expresión de los genes estudiados con la del promedio de ciclofilina.

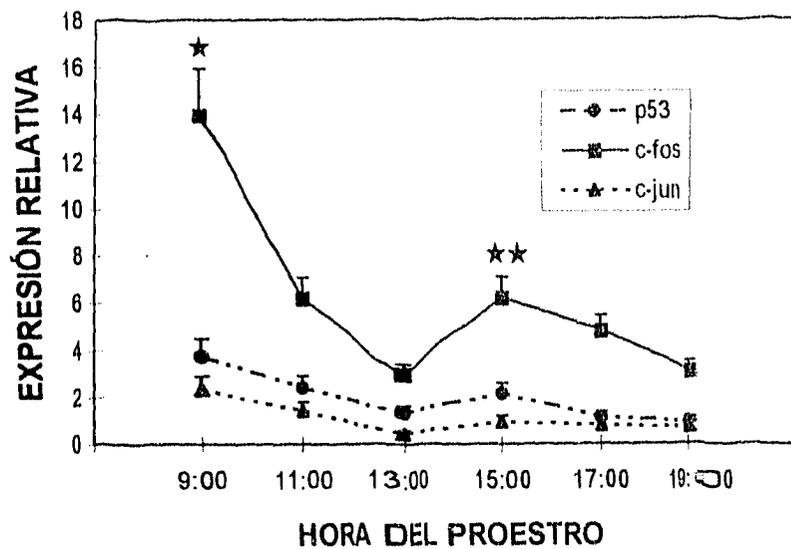


Figura 17 - Expresión de los genes p53, c-fos y c-jun durante el proestro. Se preparó RNA total de animales sacrificados a las 9:00, 11:00, 13:00, 15:00, 17:00 y 19:00 horas del día del proestro. Los resultados se presentan como los datos densitométricos de las autoradiografías. La expresión relativa se obtuvo al corregir la expresión de los genes estudiados con la de ciclofilina como se describió previamente. Los valores representan la media \pm E.S.M. * $P < 0.01$ vs las otras horas del proestro; ** $P < 0.05$ vs 13:00.

DISCUSIÓN

En esta tesis se demostró que el 17 β -estradiol induce un incremento en la expresión de p53, *c-fos* y *c-jun* en el útero de las ratas ovariectomizadas y que la expresión de p53 y *c-fos* varía en este tejido durante el ciclo estral.

Estudios previos han demostrado, usando las técnicas de Northern Blot (Loose-Mitchell et al., 1988; Cattaneo y Maggi, 1990; Bigsby y Li, 1994; Weisz et al., 1990), nuclear run-on transcription (Weisz y Bresciani, 1988; Cicatiello et al., 1992) inmunohistoquímica (Papa et al., 1991; Webb et al., 1993) e hibridación *in situ* (Nephew et al., 1994; Nephew et al., 1995), que el 17 β -estradiol activa la transcripción de los genes *c-fos* y *c-jun* en el útero de ratas ovariectomizadas. En este trabajo se ampliaron estos estudios. Usando la técnica de Transcriptasa Reversa acoplada a la Reacción en Cadena de la Polimerasa se determinó la concentración de mRNA de *c-fos*, *c-jun* y p53 en el útero de la rata tanto en condiciones farmacológicas como fisiológicas. Como modelo farmacológico se usó el útero de ratas ovariectomizadas tratadas con estradiol y como modelo fisiológico el útero de ratas intactas durante el ciclo estral.

Se utilizó la técnica de RT-PCR ya que esta es una técnica muy sensible que permite detectar pequeños cambios en la concentración de mRNA de cualquier gen. El PCR se llevó a cabo por 25 ciclos, lo cual asegura estar en la fase exponencial de la amplificación de todos los genes estudiados. Así mismo se usó un control de expresión constitutiva para poder corregir la cantidad de RNA usado en cada amplificación. En este caso se usó el gen de ciclofilina ya que su expresión no se ve alterada por hormonas esteroides (Haendler et al., 1987). Las condiciones en que se realizó el RT-PCR fueron las indicadas ya que los fragmentos obtenidos fueron del tamaño que se esperaban, solamente se observó una banda por cada gen amplificado, y en los controles negativos (muestra sin RNA o sin cDNA) no se observó banda alguna, lo cual nos indica que no tenemos problemas de contaminación.

La máxima concentración de mRNA de *c-fos* y *c-jun* en el útero de ratas ovariectomizadas se observó una hora después de la administración del estradiol. Nuestros resultados concuerdan con estudios previos en los cuales se determinó, por diferentes técnicas a las usadas en esta tesis, que la máxima inducción de la expresión de los genes de *c-fos* y *c-jun* se observa entre 30 minutos a 3 horas después de la administración de estradiol (Loose-Mitchell et al., 1988; Cattaneo y Maggi, 1990; Weisz et al., 1990; Cicatiello et al., 1992; Nephew et al., 1994). La inducción de la transcripción de estos genes puede estar mediado por el ERE presente en los genes de *c-fos* y *c-jun* (Hyder et al., 1991a; Hyder et al., 1991b; Hyder et al., 1995)

Se ha demostrado que en el útero de ratas adultas ovariectomizadas el 17 β -estradiol induce la proliferación del epitelio luminal y glandular por medio de la inducción de factores de transcripción, incluyendo varios proto-oncogenes (Weisz et al., 1990; Cicatiello et al., 1992; Bigsby y Li 1994). Esta tesis confirma que los proto-oncogenes *c-fos* y *c-jun* pueden estar directamente involucrados en la respuesta proliferativa del útero hacia el estradiol, ya que se demostró que la expresión de estos genes es inducida tempranamente y de manera notoria (incremento de 5.7 veces respecto al control) por esta hormona.

Se determinó que la expresión de p53 también es inducida tempranamente por el estradiol y la máxima expresión de este gen se observó 1 hora después del tratamiento con la hormona, de manera similar a *c-fos* y *c-jun*. Sin embargo, la inducción de la expresión del gen de p53 fue menor que la de estos dos proto-oncogenes. Estos son los primeros datos que indican que p53 es inducido por estradiol en el útero de rata. Estudios previos han demostrado que la expresión de p53 es inducida por estrógenos en cultivos celulares provenientes de tejidos tumorales de mama (Thompson et al. 1990, Hurd et al. 1995). Este descubrimiento sugiere que el gen de p53 debe de ser incluido en el grupo de genes tempranamente-activados por estrógenos y que podría participar en la subsecuente activación o represión de genes secundarios en el modelo en cascada de inducción de genes por estrógenos (Figuras 4

y 5) inicialmente propuesta por Spelsberg (Schuchard et al. 1993). Estos resultados no concuerdan con la hipótesis que planteamos, ya que esperábamos que p53 fuera inhibido por E₂. Esto nos indica que la expresión de p53 es inducida por E₂ en estas condiciones experimentales. Sin embargo, nuestra hipótesis planteada fue corroborada durante el ciclo estral como se discutirá más adelante.

Posteriormente se evaluó la expresión de los genes p53, *c-fos* y *c-jun* en el útero de rata en condiciones fisiológicas, tales como el ciclo estral, en el que se presentan cambios cíclicos importantes en el perfil celular y hormonal (Marcus 1974, Freeman 1988). Como se observa en las Figuras 16A y 17 la concentración de mRNA de *c-fos* presentó su mínimo valor en los días del metaestro y diestro, mientras que en proestro y estro aumentó alcanzando su valor máximo a las 9:00 h del día del proestro y a las 11:00 h del día del estro. La elevada expresión del gen de *c-fos* a las 9:00 h del día del proestro se podría deber al incremento en la concentración de estradiol observada en las primeras horas de este día (Freeman 1988). Como se observa en la Figura 1 la concentración de estradiol no permanece constante en el día del proestro, presenta aumentos y disminuciones lo cual podría explicar las variaciones observadas en el nivel de expresión de *c-fos* durante este día. A pesar de que las máximas concentraciones de estradiol se presentan desde la mañana hasta el mediodía del día del proestro, el otro incremento importante en la expresión del gen de *c-fos* se observó a las 11:00 h del día del estro, cuando la concentración de estradiol ha regresado a niveles basales. Estos resultados sugieren que en el útero de ratas intactas el estradiol también podría inducir la expresión del gen de *c-fos* en períodos largos de tiempo, como se ha observado en el útero de ratas ovariectomizadas, en las cuales se presenta una segunda inducción de la expresión del gen de *c-fos* por estradiol 24 h después de su administración (Cattaneo y Maggi 1990). La reducción de la concentración del mRNA de *c-fos* durante el metaestro y el diestro se podría deber al incremento en la concentración de progesterona, ya que se ha informado que esta hormona inhibe el efecto que tienen los estrógenos sobre la inducción de la expresión del gen de *c-fos* en el útero de ratas ovariectomizadas (Kirkland et al. 1992, Bigsby y Li 1994). La máxima

expresión del gen de *c-fos* detectada a las 9:00 h del proestro (Figura 17) coincide con el máximo índice mitótico reportado para el epitelio luminal uterino, el estroma y el miometrio (Tabla 1) (Clark 1971, Marcus 1974). Sin embargo no existe una correlación clara entre la disminución del índice mitótico en la mañana del estro y el incremento de la expresión del gen de *c-fos* observado en este día. Es necesaria una futura investigación para saber si este incremento es debido a la inducción tardía de *c-fos* por estrógenos descrito anteriormente o a la regulación de la expresión de este gen por otros factores de transcripción involucrados en otras funciones uterinas, además de la de proliferación.

En contraste con *c-fos*, la expresión del gen de *c-jun* se mantuvo prácticamente constante durante el ciclo estral, a pesar de que en el útero de ratas ovariectomizadas fue inducido de una manera muy importante por el 17β -estradiol (Figuras 14A, 16A y 17). Estos resultados concuerdan con los datos de Fujimoto et al. (1994), quienes encontraron que la expresión del gen de *c-jun* fue inducido por estradiol en el miometrio y endometrio del útero humano, pero su expresión no varió durante el ciclo menstrual. Otros estudios han mostrado que otros proto-oncogenes, como *c-myc* y *N-myc*, presentan este mismo patrón de comportamiento, ya que su expresión es inducida por estradiol en el útero de ratas ovariectomizadas pero no cambia durante el ciclo estral (Murphy et al., 1987). En ese estudio la expresión de los genes *c-myc* y *N-myc* solamente fue determinada en dos días del ciclo estral (diestro y proestro-estro). Estudios previos han demostrado que en ratas ovariectomizadas sin tratamiento con estradiol el gen de *c-jun* es expresado tanto en las células del epitelio como en las del miometrio. Sin embargo, cuando las ratas son tratadas con 17β -estradiol la expresión de *c-jun* disminuye de manera notoria en las células del epitelio luminal, pero se eleva significativamente en las células del miometrio (Bigsby y Li, 1994; Nephew et al., 1994). Así mismo, se ha determinado que la progesterona bloquea el efecto represivo del estradiol sobre la expresión de *c-jun* en el tejido epitelial (Bigsby y Li 1994). En este estudio se determinó la expresión de *c-jun* en el útero completo de la rata, por lo cual no se sabe cual es la contribución del miometrio y la del endometrio a la concentración

total de mRNA de *c-jun* determinada y si la falta de variaciones observadas durante el ciclo estral más bien se deba a que en algunas etapas se expresa en un tipo celular y en otras etapas en otro tipo celular. Debido a esto, es necesaria una futura investigación, por ejemplo estudios de hibridación *in situ*, para poder determinar si *c-jun* está involucrado en el control del crecimiento de los diferentes tipos celulares del útero durante el ciclo estral.

Los proto-oncogenes *c-fos* y *c-jun* están involucrados en el control de la proliferación y diferenciación celular, lo cual ocurre en el útero de manera periódica durante el ciclo estral. La función de estos proto-oncogenes es mediada por la formación de complejos proteicos AP-1, los cuales están constituidos por heterodímeros de c-Fos y c-Jun, homodímeros de c-Jun o por diferentes homo y heterodímeros de proteínas de la familias fos y jun. El hecho de que el contenido de mRNA de *c-jun* no varíe durante el ciclo estral sugiere que c-Fos puede interactuar con otros miembros de la familia de fos y jun para formar el complejo AP-1 o que los niveles de expresión bajos de *c-jun* son suficientes para producir complejos AP-1 (Nephew et al. 1994).

A pesar de que se observó que la expresión del gen de p53 es inducida por estradiol en el útero de las ratas ovariectomizadas (Figura 14A), se determinó que durante el ciclo estral la máxima expresión de p53 ocurrió durante la mañana del metaestro y diestro, cuando las concentraciones séricas de estradiol presentan su mínimo valor. A pesar de las diferencias en el nivel de estradiol, el patrón de proliferación celular es muy similar en las ratas ovariectomizadas tratadas con estradiol y en los animales intactos durante la mañana del metaestro y el diestro. En ambos casos el epitelio luminal y glandular proliferan, pero no el estroma ni el miometrio (Clark 1971, Marcus 1974). Se necesita una futura investigación, por ejemplo hibridación *in situ*, para saber si P53 está involucrada en la inhibición de la proliferación del estroma y del miometrio en ambos modelos animales.

El máximo nivel de expresión del gen de p53 se observó durante los días del metaestro y el diestro, cuando la expresión de *c-fos* alcanzó su mínimo valor. En estudios *in vitro* en fibroblastos embrionarios de rata transfectados con p53 y con genes reporteros que contienen una serie de promotores de genes inducidos por suero (incluyendo el promotor de *c-fos*) la expresión de genes que son requeridos para la proliferación celular, tales como *c-fos*, son inhibidos transcripcionalmente por p53 (Ginsberg et al. 1991). Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que esta regulación también podría ocurrir *in vivo*, como se observa en la Figura 16A, ya que se determinó que durante el ciclo estral cuando se presentan los mayores niveles de expresión de p53 se presentan los menores de *c-fos*. Lo anterior podría indicar que la expresión de *c-fos* es regulada por p53.

Como se puede observar de los resultados, solamente *c-fos* presenta un patrón de expresión similar en el modelo farmacológico como en el fisiológico. Lo anterior nos indica que en los animales intactos existen otras hormonas (por ejemplo, progesterona) y factores de transcripción, además del estradiol, que no están presentes en el útero de las ratas ovariectomizadas, los cuales están involucrados en la regulación de la transcripción de *c-jun* y p53.

A pesar de que este estudio presenta la caracterización más completa hasta este momento de los niveles de mRNA de p53, *c-fos* y *c-jun* en el útero de rata durante el ciclo estral todavía quedan muchas preguntas sin resolver: ¿en qué células del útero se presenta el aumento en la expresión de estos genes?, ¿este aumento en los niveles de mRNA se traduce en un aumento en los niveles de la proteína de p53, *c-fos* y *c-jun*?, ¿el aumento de la expresión de estos genes se puede correlacionar con el patrón de proliferación observada en los diferentes tipos celulares durante el ciclo estral?, ¿qué

genes secundarios son regulados por p53, *c-fos* y *c-jun* y que papel juegan en la proliferación del útero?, etc... Son necesarios más estudios para poder entender la compleja maquinaria que activa la proliferación y diferenciación del útero de la rata durante el ciclo estral, la cual sigue siendo un enigma en el conocimiento de la reproducción.

CONCLUSIONES

En este trabajo se estudió la regulación de la expresión de los proto-oncogenes *c-fos*, *c-jun* y del gen supresor de tumores p53 en el útero de ratas ovariectomizadas tratadas con 17 β -estradiol y en el útero de animales intactos en las diferentes etapas del ciclo estral.

Se observó que la expresión de los tres genes estudiados es inducida por 17 β -estradiol en el útero de las ratas ovariectomizadas. Lo anterior sugiere que p53 debe de ser incluido en los genes que son tempranamente-activados por estrógenos.

Así mismo, se determinó que en el útero de la rata durante el ciclo estral la máxima expresión del gen de *c-fos* ocurre en la mañana tanto del día del proestro como del estro. La máxima expresión del gen de p53 se observó durante el metaestro, mientras que la mínima se detectó en los días del proestro y estro. En contraste con *c-fos* y p53, la expresión de *c-jun* se mantuvo prácticamente constante durante el ciclo estral. Los diferentes patrones de expresión observados de los diversos genes estudiados durante el ciclo estral indican que p53, *c-fos* y *c-jun* están bajo regulación multi-hormonal.

El control global del crecimiento y función uterina es regulada por la acción de los esteroides sexuales, principalmente los estrógenos y la progesterona. Los estrógenos estimulan una serie de sucesos metabólicos y tienen un papel importante en la regulación de la proliferación del útero. La progesterona inhibe la proliferación inducida por estradiol y causa la diferenciación del endometrio a uno de tipo secretor. En este trabajo se demostró que algunos de los genes que son regulados por estrógenos y que varían su expresión durante el ciclo estral son p53 y *c-fos*. Ya que los productos proteicos de estos genes son factores de transcripción estos deben de estar involucrados en la regulación de la expresión de genes de respuesta tardía, los cuales finalmente participan en los cambios complejos típicos de la acción hormonal en el útero.

REFERENCIAS

Angel P, Hattori K, Smeal T y Karin M (1988) The jun proto-oncogene is positively autoregulated by its product, Jun/AP-1. *Cell* 55, 875.

Angel P y Karin M (1991) The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochim. Biophys. Acta* 1072, 129.

Arriza JL, Weinberg C, Cerelli G, Glaser TM, Handelin BL, Housman DE y Evans RM (1987) Cloning of the human mineralocorticoid receptor complementary DNA: structural and functional kinship with the glucocorticoid receptor. *Science* 237, 268.

Bagchi MK, Tsai SY, Tsai MJ y O'Malley BW (1990) Progesterone-dependent cell free transcription: identification of a functional intermediate in receptor activation. *Nature* 345, 547.

Baichwal VR y Tjian R (1990) Control of c-Jun activity by interaction of cell-specific inhibitor with regulatory domain: Differences between v- and c-Jun. *Cell* 63, 815.

Baker DEJ (1979) Reproduction and breeding. En: *The laboratory rat. Biology and diseases* (Baker HJ, Lindsey JR, Weisbroth SH, ed) pp 154, Academic Press, New York.

Beato M, Baretino D, Bruggemeier U, Chalepakis G, Hache RJG, Kalff M, Pina B, Schauer M, Slater EP y Truss M (1991) Characterization of DNA receptor interaction. En: *Nuclear Hormone Receptors* (Parker MG, ed.) pp 197, Academic Press, New York.

Berry M, Metzger D y Chambon P (1990) Role of the two activating domains of the oestrogen receptor in the cell-type and promoter-context dependent agonistic activity of the anti-oestrogen 4-hydroxytamoxifen. *EMBO J.* 9, 2811.

- Bertalanffy FD y Lau C (1963) Mitotic rates, renewal times, and cytodinamics of the female genital tract epithelia in the rat. *Acta anat.* 54, 39.
- Bertel DP, Sheng M, Lau LF y Greenberg ME (1989) Growth factors and membrane depolarization activate distinct programs of early response gene expression: dissociation of fos and jun induction. *Genes Dev.* 3, 304.
- Bigsby RM y Li A (1994) Differential regulated immediate early genes in the rat uterus. *Endocrinology* 134, 1820.
- Boonstra J, Moolenaar WH, Harrison PH, Moed P, Van der Saag PT y De Laat SW (1983) Ionic responses and growth stimulation by nerve growth factor and epidermal growth factor in rat pheochromocytoma (PC12) cells. *J. Cell. Biol.* 97, 92.
- Brenner DA, O'Hara M, Angel P, Chojker M y Karin M (1989) Prolonged activation of jun and collagenase genes by tumor necrosis factor- α . *Nature* 337, 661.
- Brown M y Sharp PA (1990) Human estrogen receptor forms multiple protein-DNA complexes. *J. Biol. Chem.* 65, 11238.
- Brown-Grant K, Exley D y Naftolin F (1970) Peripheral plasma oestradiol and luteinizing hormone concentrations during the oestrus cycle of the rat. *J. Endocr.* 48, 295.
- Butcher RL, Collins WE y Fugo NW (1974) Plasma concentrations of LH, FSH, prolactin, progesterone and estradiol-17 β throughout the 4-day estrous cycle of the rat. *Endocrinology* 94, 1704.

- Cattaneo E y Maggi A (1990) c-fos induction by estrogen in specific rat brain areas. Eur. J. Pharmacol. 188, 153.
- Cicatiello L, Ambrosino C, Coletta B, Scalona M, Sica V, Bresciani F y Weisz A (1992) Transcriptional activation of jun and actin genes by estrogen during mitogenic stimulation of rat uterine cells. J. Steroid Biochem. Molec. Biol. 41, 523.
- Clark BF (1971) The effects of oestrogen and progesterone on uterine cell division and epithelial morphology in spayed, adrenalectomized rats. J. Endocr. 50, 527.
- Curran T, Abate C, Cohen DR, MacGregor PF, Rauscher III, Sonnenberg JL, Connor JA y Morgan JI (1990) Inducible proto-oncogenes transcription factors: Third messengers in the brain? Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, Volume LV. pp 225, Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA.
- Dang CV, McGuire M, Buckmire M y Lee WMF (1989) Involvement of the "leucine zipper" region in the oligomerization and transforming activity of human c-myc protein. Nature 337, 664.
- Davidson NE y Lippman ME (1989) The role of estrogens in growth regulation of breast cancer. Rev. Oncogenesis 1, 89.
- Dwarki VJ, Montminy M y Verma IM (1990) Both the basic region and the "leucine zipper" domain of the cyclic AMP responsive element binding (CREB) protein are essential for transcriptional activation. EMBO J. 9, 225.
- Fawell SE, Lees JA, White R y Parker MG (1990) Characterization and colocalization of steroid binding and dimerization activities in the mouse estrogen receptor. Cell 60, 953.

- Fink KL, Wieben ED, Woloschak GE y Spelsberg TC (1988) Rapid regulation of c-myc proto-oncogen expression by progesteron in the avian oviduct. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 1796.
- Forsthoefel A y Thompson EA (1987) Glucocorticoid regulation of transcription of the c-myc cellular proto-oncogene in P1798 cells. Mol. Endocrinol. 1, 899.
- Freeman ME (1988) The ovarian cycle of the rat. En The Physiology of Reproduction, (E Knobil y J Neill, ed) pp 1893, Raven Press, Ltd, New York.
- Fuller PJ (1991) The steroid receptor superfamily: mechanisms of diversity. FASEB J. 5, 3092.
- Ginsberg D, Mechta F, Yaniv M y Oren M (1991) Wild-type p53 can down modulate the activity of various promoters. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 9979.
- Gonzalez GA, Yamamoto KK, Fischer WH, Karr D, Menzel P., et al. (1989) A cDNA for cAMP-regulated nuclear factor CREB predicts multiple phosphorylation sites. Nature 337, 749.
- Green S y Chambon P (1991) The oestrogen receptor: from perception to mechanism. En: Nuclear Hormone Receptors (Parker MG, ed.) pp15, Academic Press, New York.
- Guiochon-Mantel A, Loosfelt H, Lescop P, Sar S, Atger M, Perrot-Applanat M y Milgrom E (1989) Mechanism of nuclear localization of the progesterone receptor: evidence for interaction between monomers. Cell 57, 1147.
- Haendler T, Hofer-Warbinek R, Hofer E (1987) Complementary DNA for human T-cell cyclophilin. EMBO J 6, 947.

Hafez ESE (1970) Female reproductive organs. En: Reproduction and breeding techniques for laboratory animals (Hafez ESE, ed.) pp 74, Lea y Febiger, USA.

Hager GL y Archer TK (1991) The interaction of steroid receptors with chromatin. En: Nuclear Hormone Receptors (Parker MG, ed.) pp 217, Academic Press, New York.

Hagstrom JE, Harvey SE y Wieben ED (1989) Regulation of secretory protein production by androgens in the guinea pig seminal vesicle epithelium. II, J. Cell. Biol. 109, 117a, Abstr. #627.

Harrison SC (1991) A structural taxonomy of DNA-binding domains. Nature 353, 715.

Holt JT, Venkat GT, Moulton AD y Nienhuis AW (1986) Inducible production of c-fos antisense RNA inhibits 3T3 cell proliferation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 4794.

Hope IA y Struhl K (1987) GCN4, a eukaryotic transcriptional activator protein, binds as a dimer to target DNA. EMBO J. 6, 2781.

Hyder SM, Cram LF Y Loose-Mitchell DS (1991a) Sequence of a 1.4-kb region in the 3'-flanking region of the murine c-fos proto-oncogene which contains an estrogen-response element. Gene 105, 281.

Hyder SM, Nawaz Z, Chiappetta C, Yokoyama K y Stancel GM (1995) The proto-oncogene c-jun contains an unusual estrogen-inducible enhancer within the coding sequence. J. Biol. Chem. 270, 8506.

- Hyder SM, Stancel GM y Loose-Mitchell DS (1991b) Presence of an estradiol response region in the mouse c-fos oncogene. *Steroids* 56, 498.
- Jensen EV, Suzuki T, Kawashima T, Stumpf WE, Jungblut PW y DeSombre ER (1968) A two-step mechanism for the interaction of estradiol with rat uterus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 59, 632.
- Jones N (1990) Transcriptional regulation by dimerization: two sides to an incestuous relationship. *Cell* 61, 9.
- Jooss KU, Funk M y Müller R (1994) An autonomous N-terminal transactivation domain in Fos protein plays a crucial role in transformation. *EMBO J.* 13, 1467.
- Kaye AM, Sheratzky D y Lindner HR (1972) Kinetics of DNA synthesis in immature rat uterus: age dependence and estradiol stimulation. *Biochim. Biophys. Acta.* 261, 475.
- Kim SY, Angel P, Lafyatis R, Hattori K, Kim KY, Sporn MB, Karin M y Roberts AB (1990) Autoinduction of transforming growth factor beta 1 is mediated by the AP-1 complex. *Mol. Cell. Biol.* 10, 1492.
- Kirkland JL, LaPointe L, Justin E y Stancel GM (1979) Effects of estrogen on mitosis in individual cell types of the immature rat uterus. *Biol. Reprod.* 21, 269.
- Kirkland JL, Murthy L y Stancel GM (1992) Progesterone inhibits the estrogen-induced expression of c-fos messenger ribonucleic acid in the uterus. *Endocrinology* 130, 3223.

- Klein-Hitpass L, Tsai SY, Greene G, Clark MJ y O'Malley BW (1989) Specific binding of estrogen receptor to the estrogen response element. *Mol. Cell. Biol.* 9, 43.
- Kouzarides T y Ziff E (1988) The role of leucine zipper in the fos-jun interaction. *Nature* 336, 646.
- Kruijer W, Cooper JA, Hunter T y Verma IM (1984) Platelet-derived growth factor induces rapid but transient expression of the c-fos gene and protein. *Nature* 334, 538.
- Landers JP y Spelsberg TC (1992) New concepts in steroid hormone action: transcription factors, proto-oncogenes, and the cascade model for steroid regulation of gene expression. *Crit. Rev. Euk. Gene Express.* 2, 19.
- Landschultz WH, Johnson PF y McKnight SL (1988) The leucine zipper protein: a hypothetical Structure common to a new class of DNA binding protein. *Science* 240, 1759.
- Lau CK, Subramaniam M, Rasmussen K (1990) Rapid inhibition of c-jun proto-oncogen expression in avian oviduct by estrogen. *Endocrinology* 127, 2595.
- Lees JA, Farrel SE y Parker MG (1989) Identification of two transactivation domains in the mouse oestrogen receptors. *Nucleic Acids Res.* 17, 5477.
- Loose-Mitchell DS, Chiappetta C y Stancel GM (1988) Estrogen regulation of c-fos messenger ribonucleic acid. *Mol. Endocrinol.* 2, 946.
- Ludlow JW (1993) Interaction between SV40 large-tumor antigen and the growth suppressor protein pRB and p53. *FASEB J.* 7, 866.

- Mader S, Kumar V, de Verneuil H y Chambon P (1989) Three amino acids of the oestrogen receptor are essential to its ability to distinguish an oestrogen from a glucocorticoid-responsive element. *Nature* 338, 271.
- Marcus GJ (1974) Mitosis in the rat uterus during the estrous cycle, early pregnancy, and early pseudopregnancy. *Biol. Reprod.* 10, 447.
- Miller AD, Curran T y Verma IM (1984) c-fos protein can induce cellular transformation: a novel mechanism of activation of a cellular oncogene. *Cell* 36, 51.
- Moran E (1993) Interaction of adenoviral proteins with pRB and p53. *FASEB J.* 7, 880.
- Muegge K, Williams TM, Kant JA, Karin M, Chiu R, Schmidt A, Siebenlist U, Young HA y Durrum SK (1989) Interleukin-1 costimulatory activity on the interleukin-2 promoter via AP-1. *Science* 246, 249.
- Murdoch FE, Meier DA, Furlow D, Grunwald D y Gorski J (1990) Estrogen receptor binding to a DNA response element in vitro is not dependent upon estradiol. *Biochemistry* 29, 8377.
- Murphy LJ, Murphy LC y Friesen HG (1987) Estrogen induction of N-myc and c-myc proto-oncogen expression in the rat uterus. *Endocrinology* 120, 1882.
- Nephew KP, Peters GA y Khan SA (1995) Cellular localization of estradiol-induced c-fos messenger ribonucleic acid in the rat uterus: c-fos expression and uterine cell proliferation do not correlate strictly. *Endocrinology* 136, 3007.

- Nephew KP, Tang M, Khan SA (1994) Estrogen differentially affects c.jun expression in uterine tissue compartments. *Endocrinology* 134, 1827.
- Nephew KP, Webb DK, Akcali KC, Moulton BC y Khan SA (1993) Hormonal regulation and expression of the jun-D protooncogene in specific cell types of the rat uterus. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 46, 281.
- O'Shea EK, Rutkowski R y Kim PS (1989) Evidence that the leucine zipper is a coiled coil. *Science* 243, 538.
- Papa M, Mezzogiorno V, Bresciani F, Weisz A (1991) Estrogen induces c-Fos expression specifically in the luminal and glandular epithelia of adult rat uterus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 175, 480.
- Pertovaara L, Sistonen L, Bos TJ, Vogt PK, Keski-Oja J y Alitalo K (1989) Enhanced jun gene expression is an early genomic response to transforming growth factor beta stimulation. *Mol. Cell. Biol.* 9, 1255.
- Picard D y Yamamoto KR (1987) Two signals mediate hormone-dependent nuclear localization of the glucocorticoid receptor. *EMBO J.* 6, 3333.
- Picard D, Kumar V, Chambon P y Yamamoto KR (1990) Signal transduction by steroid hormones: nuclear localization is differentially regulated in estrogen and glucocorticoid receptors. *Cell Regul.* 1, 291.
- Quantin B y Breathnach R (1988) Epidermal growth factor stimulates transcription of the c-jun proto-oncogene in rat fibroblasts. *Nature* 334, 538.
- Quarmby VE y Korach KS (1984) The influence of 17 β -estradiol on patterns of cell division in the uterus. *Endocrinology* 114, 694.

- Ransone LJ y Verma IM (1990) Nuclear proto-oncogenes fos and jun. *Rev. Cell. Biol.* 6, 539.
- Riabowol KT, Vosatka RJ, Ziff EB, Lamb NJ y Feramisco JR (1988) Microinjection of fos-specific antibodies blocks DNA synthesis in fibroblast cells. *Mol. Cell. Biol.* 8, 1670.
- Roberts AB, Anzano MA, Wakefield LM, Roche NS, Stern DF y Sporn MB (1985) Type beta transforming growth factor: a bifunctional regulator of cellular growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 119.
- Sassone-Corsi P, Lamph WW, Kamps M y Verma IM (1988) fos associated p39 is related to nuclear transcription factor AP-1. *Cell* 54, 553.
- Sambrook J, Fritsch EF y Maniatis T (1989) Preparation of radiolabeled DNA and RNA probes. En: *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. pp 10.1-10.70, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Schauer M, Chalepkais G, Willmann T y Beato M (1989) Binding of hormone accelerates the kinetics of glucocorticoid and progesterone receptor binding to DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 1123.
- Schuchard M, Landers JP, Punkay Sandhu N, and Spelsberg TC (1993) Steroid hormone regulation of nuclear proto-oncogenes. *Endocrine Rev.* 14, 659.
- Schütte J, Minna JD y Birrer MJ (1989) Deregulated expression of human c-jun transforms primary rat embryo cells in cooperation with an activated c-Ha-ras gene and transforms rat-1a cells as a single gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 2257.

- Seto E, Usheva A, Zambetti GP, Momand J, Horikosh N, Weinmann R, Levine AJ y Shenk T (1992) Wild-type p53 binds to the TATA binding protein and represses transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89, 12028.
- Sutherland JA, Cook A, Bannister AJ y Kouzarides T (1992) Conserved motifs in Fos and Jun define a new class of activation domain. *Genes Dev.* 6, 1810.
- Tachi C, Tachi S y Lindner HR (1972) Modification by progesterone of oestradiol-induced cell proliferation, RNA synthesis and oestradiol distribution in the rat uterus. *J. Reprod. Fert.* 31, 59.
- Trapman J, Klaassen P, Kuiper G, van der Korput J, Faber PW, van Rooij H, Geurts van Kessel A, Voorhorst M, Mulder E y Brinkmann AO (1988) Cloning, structure and expression of a cDNA encoding the human androgen receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153, 241.
- Travers MT and Knowler JT (1987) Oestrogen-induced expression of oncogenes in the immature rat uterus. *FEBS Lett.* 211, 27.
- Treisman R (1985) Transient accumulation of c-fos RNA following serum stimulation requires a conserved 5' element and c-fos 3' sequences. *Cell* 42, 889.
- Truss M y Beato M (1993) Steroid hormones receptors: Interaction with deoxyribonucleic acid and transcription factors. *Endocr. Rev.* 14, 459.
- Unger T, Nau MM, Segal S y Minna JD (1992) A transdominant regulator of transcription whose function is ablated by mutations occurring in human cancer. *EMBO J.* 11, 1383.

- Vousden K (1993) Interactions of human papillomavirus transforming proteins with the product of tumor suppressor genes. *FASEB J.* 7, 872.
- Wasylyk C, Imler JL y Wasylyk B (1988) Transforming but not immortalizing oncogenes activate the transcription factor PEA1. *EMBO J.* 7, 2475.
- Wasylyk C, Wasylyk B, Heidecker G, Huleiher M y Rapp UR (1989) Expression of raf oncogenes activates the PEA1 transcription factor motif. *Mol. Cell. Biol.* 9, 2247.
- Webb DK, Moulton BC y Khan SA (1993) Estrogen induces expression of c-jun and jun-B protooncogenes in specific rat uterine cells. *Endocrinology* 133, 20.
- Webster NJ, Green S, Jin JR, Chambon P (1988) The hormone binding domain of the estrogen and glucocorticoids receptors contain an inducible transcription activation function. *Cell* 54, 199.
- Weisz A y Bresciani F (1988) Estrogen induces expression of c-fos and c-myc protooncogenes in rat uterus. *Mol. Endocrinol.* 2, 816.
- Weisz A, Cicatiello L, Persico E, Scalona M y Bresciani F (1990) Estrogen stimulates transcription of c-jun proto-oncogene. *Mol. Endocrinol.* 4, 1041.
- Weisz A y Rosales R (1990) Identification of an estrogen response element upstream of the human c-fos gene that binds the estrogen receptor and the AP-1 transcription factor. *Nucleic Acids Res.* 18, 5097.
- Williams F, Wagner F, Karin M y Kraft AS (1990) Multiple doses of diacylglycerol and calcium ionophore are necessary to activate AP-1 enhancer activity and induce markers of macrophage differentiation. *J. Biol. Chem.* 265, 18166.

Willmann T and Beato M (1986) Steroid-free glucocorticoid receptor binds specifically to mouse mammary tumour virus DNA. *Nature* 324, 688.

Zambetti GP y Levine AJ (1993) A comparison of the biological activity of wild-type and mutant p53. *FASEB J.* 7, 855.