

00581  
B



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO



FACULTAD DE QUIMICA  
PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN CIENCIAS  
BIOQUIMICAS

EXPRESION Y LOCALIZACION CELULAR DEL  
PROTO-ONCOGEN *c-fos* Y DEL GEN SUPRESOR DE  
TUMORES *p53* EN EL UTERO DE LA RATA DURANTE  
EL CICLO ESTRAL Y SU CORRELACION CON LA  
PROLIFERACION Y LA MUERTE CELULAR  
PROGRAMADA DE ESTE TEJIDO.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS (BIOQUIMICAS)

P R E S E N T A :

M. EN C. CARMEN ADRIANA MENDOZA RODRIGUEZ

DIRECTOR DE TESIS: DR MARCO ANTONIO CERBON CERVANTES



MEXICO, D. F.,

2002

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.



# PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

ENTIDAD ACADÉMICA FACULTAD DE QUÍMICA

PMDCB/096/2002

**M. en C. CARMEN ADRIANA MENDOZA RODRÍGUEZ**  
Alumna del Doctorado en Ciencias Bioquímicas  
**P r e s e n t e**

Los miembros del Subcomité Académico en reunión ordinaria del día 18 de febrero del presente año, conocieron su solicitud de asignación de JURADO DE EXAMEN para optar por el grado de DOCTORA EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS), con la réplica de la tesis "Expresión y localización celular del proto-oncogen-C-fos y del gen supresor de tumores p53 en el útero de la rata durante el ciclo estral. Análisis por hibridación *in situ*", dirigida por el Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes.

De su análisis se acordó nombrar el siguiente jurado:

PRESIDENTE	Dr. Horacio Merchant Larios
VOCAL	Dr. Alejandro García Carrancá
VOCAL	Dr. Luis Covarrubias Robles
VOCAL	Dr. Gerardo Gamba Ayala
SECRETARIO	Dr. Alejandro Zentella Dehesa
SUPLENTE	Dra. Martha Menjívar Iraheta
SUPLENTE	Dr. Armando Tovar Palacio

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

**Atentamente**  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
Cd. Universitaria, D.F., a 21 de febrero de 2002.  
LA COORDINADORA DE LA ENTIDAD ACADÉMICA

*Rosario Muñoz Clares*

**DRA. ROSARIO A. MUÑOZ CLARES**

C.c.p Archivo



## Primera carta del apóstol san Pablo a los corintios: 12, 31 - 13, 13.

Hermanos: Aspiren a los dones de Dios más excelentes. Voy a mostrarles el camino mejor de todos. Aunque yo hablara las lenguas de los hombres y de los ángeles, si no tengo amor, no soy más que una campana que resuena o unos platillos que aturden. Aunque yo tuviera el don de profecía y penetrara todos los misterios, aunque yo poseyera en grado sublime el don de ciencia y mi fe fuera tan grande como para cambiar de sitio las montañas, si no tengo amor, nada soy. Aunque yo repartiera en limosna todos mis bienes y aunque me dejara quemar vivo, si no tengo amor, de nada me sirve.

El amor es comprensivo, el amor es servicial y no tiene envidia; el amor no es presumido ni se envanece; no es grosero ni egoísta; no se irrita ni guarda rencor; no se alegra con la injusticia, sino que goza con la verdad. El amor disculpa sin límites, confía sin límites, espera sin límites, soporta sin límites.

El amor dura por siempre: en cambio, el don de profecía se acabará, el don de lenguas desaparecerá y el don de ciencia dejará de existir, porque nuestros dones de ciencia y de profecía son imperfectos. Pero cuando llegue la consumación, todo lo imperfecto desaparecerá.

Cuando yo era niño, hablaba como niño, sentía como niño y pensaba como niño; pero cuando llegue a ser hombre, hice a un lado las cosas de niño. Ahora vemos como en un espejo y oscuramente, pero después será cara a cara. Ahora sólo conozco de una manera imperfecta, pero entonces conoceré a Dios como él me conoce a mí. Ahora tenemos estas tres virtudes: la fe, la esperanza y el amor. Pero el amor es la mayor de las tres.

A Juan Carlos, el amor de mi vida. Nada tendría sentido sin ti.

A mis padres, por criarme en un ambiente lleno de amor.

A mis seres queridos que ya se encuentran en un mejor lugar,  
especialmente a los más pequeños.

A todos mis familiares y amigos, en cuyos rostros se refleja el amor de Cristo: Eduardo, Kenya, Montserrat, Octavio, Lourdes, Ángel, Rosario, Héctor, Claudia, Arturo, Francisco, Lorena, Héctor Manuel, Paty, Ana Luisa, Alfredo, Jessica, Fernando, Samuel, Eimeen, Mariana, Pablo, Laura, Marichui, Zenia, Adriana, Raúl, Luis Héctor, Fernando, Andrés.

## AGRADECIMIENTOS

No hay suficientes palabras para agradecer al Dr. Marco Cerbón por todo lo que ha hecho por mí. Gracias por todo su apoyo, su ayuda, sus consejos, su guía, su paciencia. Gracias por formarme y ser un gran amigo.

Al Dr. Horacio Merchant Larios, por todo el apoyo y enseñanza que me proporcionó a todo lo largo de la tesis. Muchas gracias por su gran ejemplo.

A la Dra. Norma Moreno Mendoza, por ayudarme a montar las técnicas de TUNEL y proliferación celular y estar siempre dispuesta a ayudarme en todo. Muchísimas Gracias.

A la Dra. M. Lourdes Segura Valdez, por enseñarme la técnica de hibridación *in situ*. Gracias por darme refugio durante la huelga.

A la Dra. María Esther Cruz, Dr. Roberto Domínguez y Biol. Paola Arteaga por proporcionar los animales utilizados en este trabajo.

A los miembros del Comité Tutoral, Dr. Horacio Merchant, Dr. Ricardo Rosales y Dr. Marco Cerbón, 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: Dr. Horacio Merchant Larios, Dr. Alejandro García Carrancá, Dr. Luis Covarrubias Robles, Dr. Gerardo Gamba Ayala, Dr. Alejandro Zentella Dehesa, Dra. Martha Menjivar Iraheta, Dr. Armando Tovar Palacio.

Al CONACyT por la beca otorgada para realizar los estudios del doctorado.

Al Programa de Apoyo a Estudios de Posgrado (PAEP) de la UNAM por el apoyo económico del proyecto 202323 que ayudó a la realización del presente trabajo

A todos los integrantes del laboratorio del Dr. Merchant: Norma, Don José, Alejandro, Leda, Francisco, Hada Lucía, Mariana, Esther, Martha. Gracias por la grata compañía y la ayuda recibida durante toda la tesis

Al Sr. Ismael, por enseñarme a cortar en el microtomo y proporcionármelo siempre que fue necesario.

A Lety García, por toda la ayuda recibida para la realización de los trámites que realicé durante el doctorado.

A todos los integrantes del laboratorio 202: Isabel, Mauricio, Gaby M, Lety, Nelly, Luciano, Paola, Francis, Andrea, Gaby G, Christian, Aliesha, Olga, Angélica, José, Lupita, Dr. Camacho, Dra Quintero, Dr. García Tamayo, Silvia, Margarita Gracias por su amistad, compañía y ayuda que permitieron que este trabajo llegara a su fin.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a todos los profesores que contribuyeron en mi formación profesional.

El presente 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.



# INDICE

<b>1. RESUMEN</b>	<b>4</b>
<b>1. ABSTRACT</b>	<b>5</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN</b>	<b>6</b>
<b>3. ANTECEDENTES</b>	<b>9</b>
<b>3.1 Ciclo estral de la rata</b>	<b>9</b>
3 1 1 Niveles hormonales	9
3 1 2 Proliferación celular del útero durante el ciclo estral	13
3 1 3 Muerte celular del útero durante el ciclo estral	16
<b>3.2 Regulación de la transcripción por hormonas esteroides sexuales</b>	<b>17</b>
3 2.1 Características moleculares de los receptores a hormonas esteroides	17
3 2.2 Mecanismo general de la regulación de la expresión génica por hormonas esteroides	18
<b>3.3 <i>C-fos</i></b>	<b>20</b>
3 3 1 Generalidades	20
3 3 2 Estructura	21
3 3 3 Función de AP-1 en la proliferación	23
3 3 4 Regulación de la expresión de <i>c-fos</i>	26
3 3 5 Regulación de la expresión de proto-oncogenes por hormonas esteroides	27
<b>3.4 El gen supresor de tumores <i>p53</i>: mecanismo de acción en la proliferación y muerte celular</b>	<b>31</b>
3 4 1 Estructura y función de <i>p53</i>	31

3.4.2 Inducción y activación de p53	33
3.4.3 Regulación del ciclo celular y apoptosis por p53	33
<b>4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	<b>37</b>
<b>5. OBJETIVOS GENERALES</b>	<b>38</b>
5.1 Objetivos particulares	38
<b>6. HIPÓTESIS DE TRABAJO</b>	<b>39</b>
<b>7. MATERIAL Y METODOS</b>	<b>40</b>
7.1 Animales de experimentación	40
7.2 Procesamiento del tejido	40
7.3 Determinación del índice apoptótico	40
7.4 Microscopia electrónica	41
7.5 Determinación de proliferación celular	41
7.6 Preparación de plásmidos	42
7.7 Transcripción <i>in vitro</i>	42
7.8 Hibridación <i>in situ</i>	43
7.9 Inmunohistoquímica	44
7.10 Cuantificación hormonal	45
7.11 Análisis estadístico	45
<b>8. RESULTADOS</b>	<b>46</b>
8.1 Microscopia electrónica	46
8.2 Cuantificación del índice apoptótico	48
8.3 Evaluación del ARNm de p53 por hibridación <i>in situ</i>	50
8.4 Evaluación de la proteína de p53 por inmunohistoquímica	53
8.5 Evaluación de la proliferación celular	55

8.6 Evaluación del ARNm de <i>c-fos</i> por hibridación <i>in situ</i>	58
8.7 Evaluación de la proteína c-Fos por inmunohistoquímica	61
8.8 Detección del receptor a estrógenos $\alpha$ y $\beta$ por inmunohistoquímica	63
8.9 Niveles hormonales	66
<b>9.0 DISCUSIÓN</b>	<b>68</b>
9.1 Proliferación y muerte celular en el epitelio uterino de la rata durante el ciclo estral	68
9.2 Expresión de <i>p53</i> en el epitelio uterino de la rata durante el ciclo estral	71
9.3 Expresión de <i>c-fos</i> y del receptor a estrógenos $\alpha$ en el epitelio uterino de la rata durante el ciclo estral	74
<b>10. CONCLUSIONES</b>	<b>80</b>
<b>11. PERSPECTIVAS</b>	<b>82</b>
<b>12. REFERENCIAS</b>	<b>83</b>
<b>13. ANEXOS</b>	<b>93</b>
Anexo 1	93
Anexo 2	94
Anexo 3	95
Anexo 4	96

## 1. RESUMEN

Desde hace mucho tiempo existe el dogma de que las hormonas esteroideas regulan el fenómeno de proliferación y muerte celular del endometrio uterino, sin embargo, aun no se conoce bien como se llevan a cabo dichos fenómenos ni los mecanismos moleculares por medio de los cuales las hormonas esteroideas regulan el crecimiento y la muerte del epitelio. En el presente estudio se determinó la proliferación y muerte celular del epitelio luminal y glandular del útero de la rata durante las diferentes etapas del ciclo estral y su correlación con la expresión del receptor a estrógenos (RE), el proto-oncogen *c-fos* y el gen supresor de tumores *p53* como parte de la cascada de eventos que inducen la proliferación y muerte secuencial del epitelio uterino durante el ciclo estral. Los resultados mostraron que tanto el epitelio luminal como el glandular presentan una máxima proliferación durante las primeras fases del ciclo estral, en el metaestro y el diestro, sin embargo durante el proestro solo presentó proliferación el epitelio luminal. Durante la etapa del estro, ninguno de los dos epitelios presenta proliferación, solamente las células del estroma proliferan. El RE $\alpha$  fue detectado tanto en células del epitelio glandular como luminal en las primeras etapas del ciclo (metaestro y diestro), pero disminuyó en forma significativa en las siguientes etapas (proestro y estro). En contraste el RE $\beta$  no fue detectado en el epitelio en ninguna de las etapas del ciclo. El máximo contenido del ARN mensajero de *c-fos*, así como la proteína fue detectado, en ambos epitelios, durante el día del metaestro, mientras que su valor más bajo fue observado en el día del estro. Se observó una correlación entre el máximo contenido de la proteína c-Fos en el epitelio luminal y la proliferación de este tipo celular, y la misma tendencia se observó en el epitelio glandular, a pesar de que la correlación no fue significativa. En conclusión los resultados de este estudio sugieren que la proteína c-Fos participa en la regulación de la proliferación del epitelio uterino durante el ciclo estral de la rata.

En relación con la muerte celular del epitelio, el más alto índice apoptótico tanto del epitelio luminal como del glandular se observó en el día del estro y el más bajo en el día del proestro. En ambos epitelios, el máximo contenido del ARN mensajero de *p53* fue detectado durante el metaestro. Durante esta etapa, ambos epitelios presentaron su máxima proliferación. El contenido del ARN mensajero de *p53* disminuyó en los días siguientes y presentó su valor mínimo en el día del estro. La proteína de *p53* se detectó en ambos epitelios durante los días del metaestro y diestro. Durante el proestro, se detectó predominantemente en el epitelio glandular. Sin embargo, en el día del estro, la proteína se detectó tanto en el núcleo como en el citoplasma de las células del epitelio luminal, pero predominantemente en el citoplasma. Los resultados indican que los niveles más altos tanto del mensajero como de la proteína de *p53* se detectaron durante el metaestro y el diestro, cuando el índice apoptótico fue más bajo. Esto sugiere que *p53* tiene un papel fisiológico importante durante las fases proliferativas del ciclo estral en el útero de la rata.

## 1.ABSTRACT

It has been well recognized that epithelial cells of the rat endometrium cyclically proliferate and die during the estrous cycle. Nevertheless, the molecular mechanisms by which the steroid hormones regulate epithelial proliferation and cellular death are still unknown. The aim of the present study was to evaluate cellular proliferation and death of the luminal and glandular epithelium of the rat uterus during the estrous cycle and correlate them with the expression of estrogen receptor (ER), *c-fos* proto-oncogen and *p53* tumour suppressor. The results show that both epithelia (luminal and glandular) present the maximal proliferation during the metestrus and diestrus days. However, during proestrus day only luminal epithelium presented proliferation, and during the estrus day only the stromal cells proliferated. A marked immunostaining for ER $\alpha$  was detected in both luminal and glandular epithelia during early phases of the cycle but diminished during proestrus and estrus days. In contrast, ER $\beta$  was undetectable in both epithelia during all stages of the cycle. The highest *c-fos* mRNA level was detected in both epithelia on metestrus day, and the highest protein content was observed on metestrus and diestrus days, and their minimal values were detected on the estrus day. The overall results indicate that c-Fos protein presented a good correlation with uterine luminal epithelium cell proliferation, and the same tendency was observed in glandular epithelium, although no significant correlation was observed. In conclusion, the results suggest that c-Fos participates in the regulation of uterine epithelial cell proliferation during the rat's estrous cycle.

With regard to the cellular death of the epithelium, the highest apoptotic index in both the luminal and the glandular epithelia was observed on the estrus day whereas the lowest one was observed on the proestrus day. The highest *p53* mRNA content was observed on the metestrus day both in the luminal and the glandular epithelia. During this period both epithelia presented high proliferation. The content of *p53* mRNA markedly decreased in the following days, presenting its minimal values on the estrus day. The highest number of p53 immunopositive nuclei, in both the luminal and the glandular epithelia, was also detected on the metestrus day, while the lowest one was found on estrus day. On the proestrus day, p53 protein was predominantly detected in the glandular epithelium. However, on the estrus day, p53 protein was detected both in the nuclei and in the cytoplasm of luminal epithelial cells, but predominantly in the cytoplasm. The overall results indicate that *p53* expression at both mRNA and protein level is higher on the metestrus day when the apoptotic index is low. This suggests that p53 could play an important physiological role during the proliferative phases of the estrous cycle in the rat uterus.

## 2.INTRODUCCIÓN

El útero de la rata es un tejido blanco clásico para el estudio de la acción de las hormonas esteroides. Durante el ciclo estral, el útero presenta cambios morfológicos importantes que incluyen la proliferación celular en ambos epitelios (luminal (EL) y glandular (EG)) y la degeneración de estos después de la ovulación (Bertalanffy y Lau, 1963; Marcus, 1974; Spornitz et al., 1994). Estos eventos ocurren en respuesta a los cambios cíclicos de los niveles de hormonas esteroides (Butcher et al., 1974).

Los estrógenos inducen la replicación del ADN y la proliferación celular en el útero de los mamíferos (Clark, 1971; Kaye et al., 1972; Marcus, 1974), la cual es inhibido por la progesterona (P<sub>4</sub>) (Kirkland et al., 1979; Martin et al., 1973). El mecanismo de acción de los estrógenos resulta de la interacción con el receptor de estrógenos (RE), el cual es un factor de transcripción ligando específico. El complejo RE-ligando específico interacciona con sitios de unión específicos del ADN que se llaman elementos de respuesta a estrógenos (ERE), en genes blanco y estos complejos se asocian con coactivadores (o correpresores) y otras proteínas reguladoras las cuales forman lo que se llama el complejo de transcripción activo (Mendoza-Rodríguez et al., 2001a). El complejo RE-ligando activo modifica la expresión de múltiples genes, entre los cuales podemos citar al receptor de progesterona (PR) (Kraus y Katzenellenbogen, 1993; Savouret et al., 1994), el factor de crecimiento epidermoide (DiAugustine et al., 1988; Huet-Hudson et al., 1990), el factor de crecimiento similar a la insulina (Murphy y Ghahary, 1990), así como diferentes proto-oncogenes como *c-fos* (Loose-Mitchell et al., 1988; Bigsby y Li, 1994; Nephew et al., 1995), *c-jun*, *jun-B*, *jun-D* (Weisz et al., 1990; Webb et al., 1993; Nephew et al., 1993), *c-myc* y *n-myc* (Murphy et al., 1987; Travers y Knowler 1987; Weisz y Bresciani 1988). Las proteínas Fos y Jun forman parte del factor de transcripción llamado complejo AP1, cuya función es mediar la diferenciación y la proliferación celular. En el ratón se ha caracterizado un ERE en el proto-oncogen *c-fos* tanto en la región

del extremo 5' como en el del 3' (Hyder et al , 1991a y b) En el caso del humano dicho elemento se ha caracterizado en la región 5' (Weisz y Rosales, 1990).

De todos los tipos celulares que conforman el útero (epitelios, estroma y miometrio), solamente el EL y el EG proliferan en respuesta a los estrógenos en la rata adulta ovariectomizada (Clark, 1971) Se sabe que el gen *c-fos* se induce en forma rápida y transitoria en el EL y en el EG del útero de estas ratas (Loose-Mitchell et al , 1988; Nephew et al , 1995; Papa et al , 1991). Estos datos sugieren que la expresión del gen de *c-fos* juega un papel importante en la proliferación del epitelio uterino. Sin embargo la expresión de este gen en el útero de la rata solo ha sido estudiada en animales ovariectomizados (ovx) tratados con dosis farmacológicas de estradiol

Se ha demostrado que el útero de diversos mamíferos, incluyendo el humano, presentan muerte celular por apoptosis (Spornitz et al , 1994; Sandow et al , 1979; Pollard et al , 1987; Spencer et al , 1996). Es bien sabido que el proceso apoptótico involucra la participación de diversos genes, incluyendo a *p53* (Bates y Vousden, 1999) *p53* es un factor de transcripción que en condiciones normales está involucrado en el mantenimiento de la estabilidad genómica. Esta proteína inhibe la progresión del ciclo celular e induce la muerte celular en respuesta a estrés genotóxico o hipóxico o a condiciones de crecimiento sub-óptimo (Levine, 1997). *p53* también parece ser requerido para la proliferación celular normal (Reich y Levine, 1984; Steinmeyer et al , 1990) Este gen está mutado o inactivado en más del 50% de los cáncer humanos (Hollstein et al , 1994; Hietanen et al , 2000) A pesar del gran número de estudios de la expresión de *p53* en células derivadas de diversos cáncer y de tejido tumoral, se han realizado pocos estudios de la expresión de este gen en el tejido reproductivo femenino humano normal (Brys et al., 2000; Westhof et al., 2000). Se ha demostrado que la expresión de *p53* es dependiente del tejido (Westhof et al , 2000). Sin embargo, no existe información de la expresión de *p53* durante el ciclo estral

El útero de la rata durante el ciclo estral representa un modelo adecuado para evaluar, en condiciones fisiológicas, la expresión de genes involucrados en el proceso de proliferación y muerte celular de este tejido, ya que los cambios cíclicos en los niveles de estradiol y progesterona inducen la proliferación y la muerte del epitelio uterino durante el ciclo estral

En el presente estudio, los genes de *c-fos* y *p53* fueron evaluados en el útero de ratas intactas durante el ciclo estral por inmunohistoquímica y por hibridación *in situ* para localizar tanto la proteína como el ARNm en células específicas del endometrio. La expresión de la proteína y del ARNm de *c-fos* se correlacionó con la proliferación del epitelio (determinada por medio de la incorporación de bromodeoxiuridina al ADN) y con la expresión del receptor a estrógenos en el útero de la rata durante el ciclo estral. La expresión de la proteína y del ARNm de *p53* se correlacionó con la muerte celular del epitelio (determinada por TUNEL y por microscopía electrónica) durante el ciclo estral



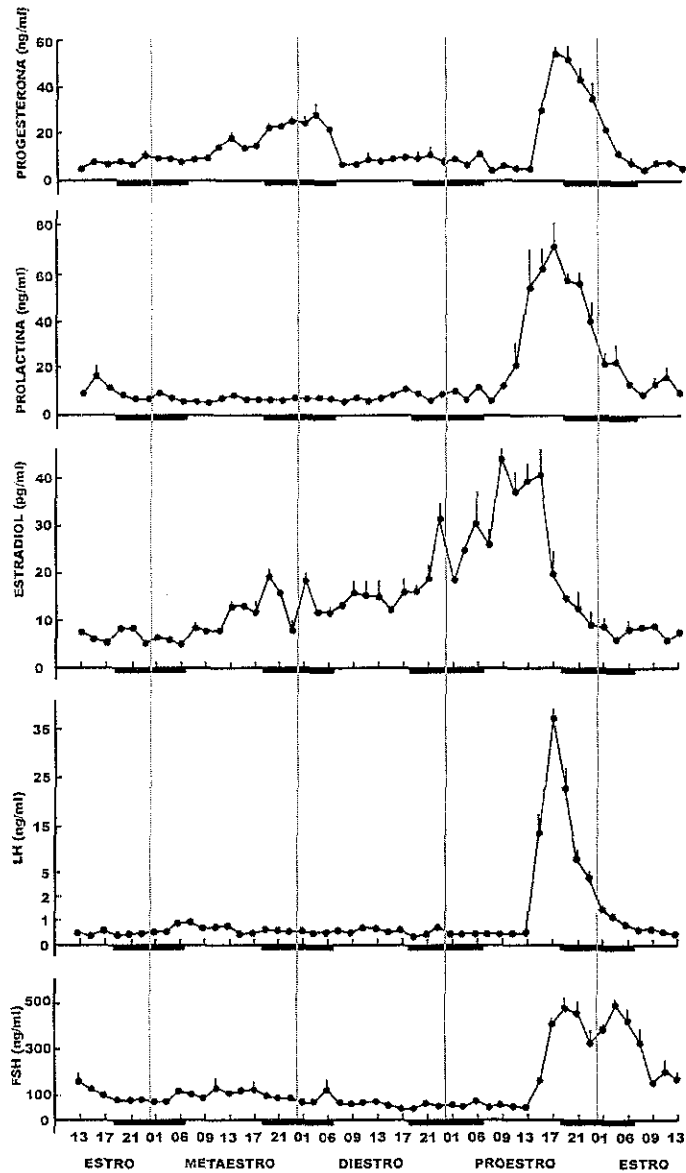
### 3. ANTECEDENTES

#### 3.1 CICLO ESTRAL DE LA RATA

##### 3.1.1 Niveles hormonales

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 ( $8 \pm 2$  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 ( $45 \pm 2$  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 ( $37 \pm 5$  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).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Este rápido incremento de LH induce la ruptura folicular y la ovulación en las primeras horas del estro. El nivel en sangre de LH empieza a disminuir en la noche del proestro, alcanza niveles basales ( $0.5 \pm 0.15$  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 ( $46 \pm 7$  ng/ml). Este incremento sucede casi simultáneamente al incremento de LH. Los niveles de progesterona vuelven a niveles basales ( $2 \pm 1$  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 ( $24 \pm 3$  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 rata, 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 está 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 (epitelio luminal) con extensiones glandulares (epitelio glandular) 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 (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)

### **3.1.2 Proliferación celular del útero durante el ciclo estral**

La proliferación de cada uno de estos tipos celulares durante el ciclo estral ha sido determinada por medio de la medición de la actividad mitótica uterina, sin embargo los resultados de diferentes grupos no coinciden perfectamente entre sí. Marcus reportó que 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 (Tabla 1) (Marcus, 1974). Bertalanffy y Lau también han reportado proliferación de este tipo celular en el día del diestro (Tabla 2) (Bertalanffy y Lau, 1963). El estudio de Marcus reportó que el

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

Día del ciclo		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
Estró	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

**Tabla 2. Actividad mitótica uterina durante el ciclo estral (Bertalanffy y Lau, 1963).**

Día del ciclo	Porcentaje de mitosis							
	Epitelio Luminal				Epitelio Glandular			
	10 am- 4 pm	4 pm- 10 pm	10 pm- 4 am	4 am- 10 am	10 am- 4 pm	4 pm- 10 pm	10 pm- 4 am	4 am- 10 am
Proestro	10.1	4.3	7.7	3.9	0.5	0.7	0.3	0.3
Estró I	2.8	3.8	1.7	4.8	0.7	0.9	1.1	1.0
Estró II	0.5	0.8	3.5	2.2	0.3	0.2	0.5	0.4
Metaestro	5.0	3.8	0.9	3.2	9.0	6.6	3.2	7.5
Diestro I	4.9	2.2	6.5	9.2	3.5	0.4	2.6	8.1
Diestro II	5.1	4.1	1.9	4.1	4.4	2.2	0.8	1.1

epitelio glandular solamente prolifera durante el metaestro, mientras que el de Bertalanffy y Lau reportan que este tipo celular prolifera tanto en metaestro como en diestro (Tabla 1 y 2). En el estroma endometrial, Marcus reportó que la mitosis

ocurre en la tarde del diestro y la mañana del proestro, mientras que Bertalanffy y Lau la detectan principalmente en el estro y metaestro. En el miometrio, la máxima proliferación ocurre durante el proestro, pero es menos intensa que en el epitelio luminal (Marcus, 1974).

Este comportamiento no se observa ni en las ratas inmaduras ni en las ratas adultas ovariectomizadas (ovx) tratadas con estradiol. En las ratas inmaduras una sola dosis de estrógenos (50 ng/rata) induce la proliferación en todos los tejidos uterinos: epitelios, 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 ( $P_4$ ). Las ratas adultas ovariectomizadas que han sido tratadas con  $17\beta$ -estradiol (0.2  $\mu$ g/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  $17\beta$ -estradiol ( $E_2$ ), 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  $E_2$  (Tachi *et al.*, 1972). El pretratamiento con  $P_4$  suprime la acción mitogénica del  $E_2$  tanto en el epitelio luminal como glandular y causa una respuesta mitótica en el estroma en respuesta al  $E_2$ . El estroma comienza a proliferar 12 h después del tratamiento con  $P_4$  (5 mg diarios por 1 a 7 días) +  $E_2$  (0.2  $\mu$ g/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  $P_4$  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  $P_4$  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

### 3.1.3 Muerte celular del útero durante el ciclo estral

La muerte celular ocurre a lo largo de la vida de los organismos multicelulares y está estrictamente regulada. Algunos ejemplos destacados de apoptosis incluyen la involución de la cola del renacuajo durante el desarrollo, la selección negativa de linfocitos para eliminar células autoreactivas o no-reactivas, la muerte celular de células neuronales durante el auto-ensamblaje del sistema nervioso central y la formación de dígitos por la involución de las células de los intertrigos. La apoptosis es un proceso regulado, controlado por diversas señales intra y extracelulares, la cual se encuentra involucrada en la muerte coordinada de células somáticas que se encuentran en exceso, que son peligrosas o que se encuentran dañadas (Zörnig et al., 2001). Se ha demostrado que el útero de diversos mamíferos, incluyendo el humano, presentan muerte celular por apoptosis (Sandow et al., 1979; Pollard et al., 1987; Spornitz et al., 1994; Spencer et al., 1996). Usando una metodología histomorfológica se ha observado muerte celular por apoptosis en el útero de la rata, en el cual se ha establecido una correlación inversa entre la proliferación y la muerte celular (Spornitz et al., 1994). Sin embargo, hasta hace poco tiempo no existía información sistemática de la muerte celular del útero de la rata durante el ciclo estral. Más recientemente se ha reportado el índice apoptótico de este tejido durante el ciclo, sin embargo los resultados de diferentes grupos no coinciden perfectamente entre sí (Sato et al., 1997; Burroughs et al., 2000; Lai et al., 2000). El estudio de Sato reporta que el máximo índice apoptótico del epitelio luminal se presenta en el día del metaestro, mientras que el grupo de Burroughs y el de Lai lo reportan en el día del estro. En el epitelio glandular, tanto el grupo de Burroughs como el de Sato reportan el máximo índice apoptótico en el día del estro. En el estroma, el grupo de Burroughs reporta el máximo índice apoptótico



en el día del estro mientras que Sato no detecta fluctuaciones durante todo el ciclo

A diferencia del útero, la mayoría de las células epiteliales de la vagina presentan muerte celular por diferenciación terminal y no por apoptosis (Sridhar Rao *et al.*, 1998). Sin embargo, algunas células son eliminadas por apoptosis, involucrando fragmentación del ADN. Las células epiteliales de la vagina presentan cambios bioquímicos y morfológicos, durante el ciclo estral, que resultan en su división, diferenciación, cornificación y descamación. Histológicamente, el epitelio vaginal está organizado en compartimentos basales proliferativos, y compartimentos suprabasales de células diferenciadas. Las células de las capas basales migran hacia el lumen diferenciándose de manera estratificada. Este proceso culmina en la formación de la capa de células muertas cornificadas, que finalmente se descaman hacia el lumen vaginal. Estas células muertas no presentan fragmentación de ADN y sus niveles de expresión de *bcl-2* se mantienen elevados (Sridhar Rao *et al.*, 1998)

## 3.2 REGULACIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN POR HORMONAS ESTEROIDES SEXUALES.

El mecanismo de regulación de la transcripción por hormonas esteroides sexuales se comenta extensamente en el artículo presente en el **Anexo 1**. A continuación se presenta un resumen de dicho artículo.

### 3.2.1 Características moleculares de los receptores a hormonas esteroides

Los esteroides sexuales llevan a cabo su función por su interacción con receptores específicos. Estos receptores a hormonas esteroides forman parte de una superfamilia de proteínas con un alto grado de homología, los cuales son activados al unirse el ligando. Estos receptores funcionan como factores de

transcripción que tienen estructura y funciones muy similares. La mayoría de los estudios indican que estos factores de transcripción al interactuar con el ADN aumentan el reclutamiento del complejo de pre-iniciación con los factores generales de la transcripción (FGT) en promotores específicos.

El análisis detallado de la estructura y función de estos receptores ha permitido establecer características generales de los miembros de esta superfamilia. En forma breve podemos decir que a lo largo del receptor encontramos diferentes funciones: en la región amino terminal (dominio A/B) se encuentra la función de activación o AF-1. En la región central (dominio C) se encuentra el dominio de unión al ADN (o DNA binding domain -DBD), así como una región de charnela o bisagra (dominio D) la cual contiene la señal de localización nuclear. En la región carboxilo terminal (dominio E) se encuentra el dominio de unión al ligando (LBD), así como otra función de activación (AF-2) y una región de dimerización.

### **3.2.2 Mecanismo general de la regulación de la expresión génica por hormonas esteroideas**

Como se puede observar los dominios funcionales reflejan el complejo del mecanismo de acción, sin embargo la mayoría de los estudios realizados hasta ahora han permitido la caracterización casi completa del mecanismo de acción de estos receptores activados por el ligando. En realidad todos los pasos de este proceso involucran desde la activación del receptor por la unión a la hormona, un cambio en la estructura del receptor y su disociación de las proteínas de choque térmico, la dimerización y su interacción con los elementos de respuesta (ERH) en el ADN. Estos ERH son secuencias palindrómicas de ADN de 15-20 pares de bases localizadas en el extremo 5' (o incluso dentro del gen) de genes regulados por hormonas.

Una fase menos caracterizada en el mecanismo de acción, es la secuencia de eventos que se llevan a cabo después de que el receptor activado interacciona con el ADN. Se ha demostrado que los receptores son capaces de reclutar correguladores. A la fecha, se han identificado alrededor de 30 diferentes coactivadores o complejos coactivadores que están involucrados en la activación de la transcripción regulada por receptores nucleares (McKenna *et al.*,1999) Muchos de estos coactivadores son bifuncionales ya que contienen una actividad enzimática además de su dominio de coactivación. Entre las actividades enzimáticas que se han caracterizado en diferentes coactivadores se encuentran dominios con actividad de acetiltransferasa, metiltransferasa, ATPasa, cinasa y ubiquitin-ligasa, los cuales actúan sobre histonas, receptores, complejos de cofactores y factores generales de transcripción basal, facilitando la entrada subsecuente de diferentes complejos preparando al promotor para la iniciación de la transcripción. El incremento en la acetilación del extremo amino terminal de las histonas se ha correlacionado con la activación de la transcripción, mientras que la hipoacetilación se ha asociado con represión. La visión que prevalece actualmente es que la hiperacetilación del extremos amino terminales de las histonas resulta en alteraciones de las interacciones entre las cargas positivas de las histonas y las cargas negativas del ADN, creando, por lo tanto, un ambiente más accesible a los factores de transcripción (Wolffe y Pruss, 1996) Un efecto adicional de la acetilación de los residuos de lisina de los extremos amino terminales de las histonas es el de alterar la estructura de la cromatina (Rhodes, 1997). Algunos cofactores que presentan la actividad enzimática de acetiltransferasa son: p300, CBP (CREB binding protein), PCAF (p300/CBP-associated factor) y la familia de proteínas SRC (steroid receptor coactivator) (McKenna *et al.*,1999). Otros coactivadores que alteran la estructura del nucleosoma son aquellos que tienen actividad intrínseca de ATPasa como los productos de los genes *bmm* (brahma) y *brg-1* (brahma-related gene 1) (McKenna *et al.*,1999). Un modelo para el papel que juegan las acetiltransferasas y las enzimas que modifican la cromatina en el reclutamiento del complejo de preiniciación por receptores unidos a su ligando se describe a continuación. El receptor unido a su ligando se asocia con miembros de

la familia de SRC y otras acetilasas de histonas (PCAF, p300 y CBP), así como coactivadores que tienen actividad enzimática de ATPasas capaces de modificar la estructura de la cromatina (hBRM/BRG-1). Estos coactivadores efectúan alteraciones en el nucleosoma en la región del enhancer/promotor. Subsecuentemente se lleva al cabo la interacción con complejos coactivadores tales como DRIP/ARC y Mediator, los cuales se piensa que establecen un vínculo directo con los factores generales de la transcripción y la ARN Pol II, lo cual resulta en la estabilización del complejo de preiniciación y la activación de la transcripción (McKenna y O'Malley, 2000)

### 3.3 C-FOS

#### 3.3.1 Generalidades

El proto-oncogen *c-fos* originalmente fue descrito como el homólogo celular del oncogen presente en el retrovirus murino FBJ-MuSV (Van Beveren *et al.*, 1983). El gen de *c-fos* se expresa 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* es 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, aun 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 la familia de *c-fos* y *c-jun*.

### 3.3.2 Estructura.

La proteína codificada por el gen de *c-fos* (c-Fos) es una fosfoproteína nuclear que está constituida por 380 aminoácidos. La proteína tiene 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  $\alpha$ -hélice, los residuos de leucina quedan alineados a lo largo de una cara de la hélice. Los residuos de leucina de una  $\alpha$ -hélice interactúan con los residuos de leucina presentes en otra  $\alpha$ -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 forme un heterodímero con miembros de la familia de Jun 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 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, FosB, 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 carboxilo 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 ADN, ya que inserciones o pérdidas en esta región disminuyen o anulan la unión al ADN pero no la formación del dímero. Las mutaciones que anulan la unión al ADN son arginina (R) 144, R155 y R159 de la proteína de *c-fos* por valina o los aminoácidos R262, R273 y lisina 276 por valina de la proteína de *c-jun* (Ransone *et al*, 1990). 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, cuya secuencia consenso es: 5'-TGA G/C TCA-3'. Los diferentes complejos AP-1 presentan diferentes actividades de unión al ADN. Los heterodímeros Fos:Jun presentan una mayor actividad de unión al ADN que los homodímeros Jun:Jun. En experimentos de unión a ADN que contiene el elemento de respuesta a AP-1 se observó que el heterodímero Fos:Jun se une a la secuencia a una concentración de 0.02 ng del fragmento de ADN, mientras que es necesario 0.3 ng del fragmento de ADN para observar la unión del homodímero de Jun. El análisis densitométrico de la autoradiografía indicó que a la misma concentración de ADN, el heterodímero Fos:Jun se une 25 veces más a la secuencia AP-1 de ADN que el homodímero de Jun (Halazonetis *et al*, 1988). Este aumento en la actividad de unión al ADN de los heterodímeros Fos:Jun se refleja en 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 ADN, se debe de mantener presente que la proteína completa interactúa y que aminoácidos fuera de estos dominios también contribuyen a la dimerización y unión al ADN (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 carboxilo terminal (Baichwal y Tjian, 1990). En Fos se han localizado en el extremo carboxilo 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**

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 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 $\alpha$ , PDGF, estrógenos y otros (Brenner *et al.*, 1989;

Treisman, 1985; Kruijer *et al.*, 1984; Quantin y Breathnach, 1988; Weisz y Bresciani, 1988). Células en crecimiento logarítmico contienen niveles más altos del ARNm 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 ARN antisentido de *c-fos* en fibroblastos en cultivo inhibe la síntesis de ADN y la proliferación celular (Riabowol *et al.*, 1988; Holt *et al.*, 1986). Transfecciones transitorias 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, hasta hace poco los únicos genes involucrados en la inducción de la proliferación que se conocían, cuya expresión es regulada por AP-1, son genes cuyos productos son factores de crecimiento tales como TGF $\alpha$ , TGF $\beta$  e IL-2 (Kim *et al.*, 1990; Muegge *et al.*, 1989). La inducción de estos genes, a pesar de que afectan la proliferación celular, no explicaban como AP-1 participa en el compromiso para la replicación del ADN después del estímulo mitogénico. Recientemente se ha identificado que la secuencia reguladora del gen humano de la ciclina D1 (*CycD1*) contiene dos sitios de unión a AP-1 (5'-TGACTCA-3' y 5'-TAACGTCA-3') (Albanese *et al.*, 1995; Herber *et al.*, 1994). Se ha demostrado que varias proteínas AP-1 se unen a estos sitios, incluyendo c-Jun, JunB, cFos y ATF, y regulan la transcripción de *CycD1* (Brown *et al.*, 1998; Beier *et al.*, 1999; Wisdom *et al.*, 1999; Bakiri *et al.*, 2000). Las proteínas ciclina D son reguladoras de la progresión a lo largo de la fase G1 del ciclo celular y se unen a las proteínas llamadas cinasas dependientes de ciclinas 4 y 6 (Cdk4, Cdk6) (ver figura 1 del artículo de revisión de *p53*). Este complejo proteico fosforila y, por lo tanto, inactiva a la proteína Rb, liberando al factor de transcripción E2F, permitiendo la expresión de diversos genes que se requieren en la fase S del ciclo celular, incluyendo a las ciclinas E y A, cdk1, B-myb, dihidrofolato reductasa, timidin cinasa y ADN polimerasa  $\alpha$ . La ciclina E se asocia con cdk2, y



este complejo cinasa se requiere para que se lleve a cabo la transición de la fase G1 a S. El complejo ciclina E/cdk 2 mantiene a Rb en su estado hiperfosforilado, y por lo tanto participa en una retroalimentación positiva para la acumulación de E2F activo

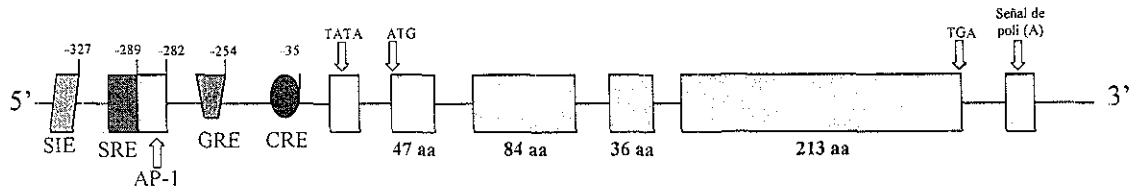
A pesar de la inducción importante de la expresión de *c-fos* en respuesta a factores de crecimiento, lo que sugiere que *c-fos* es esencial para la proliferación celular, el ratón knockout para el gen de *c-fos* demostró que c-Fos no es esencial para la viabilidad, proliferación y diferenciación de la mayoría de los tipos celulares, a excepción de algunas células involucradas en la formación de huesos, gametogénesis y ciertas funciones neuronales (Johnson *et al.*, 1992). Los ratones homocigotos *c-fos* *-/-*, presentan disminución del peso de la placenta y del feto y hay una disminución importante de su viabilidad al momento del nacimiento. Aproximadamente el 40 % de los mutantes homocigotos sobreviven y crecen normalmente hasta que desarrollan osteopetrosis severa, con deficiencias en el remodelado de los huesos y ausencia de la erupción de los dientes, lo cual ocurre a los 11 días de edad. Entre otras anomalías, estos ratones presentan gametogénesis retrasada o ausente, linfopenia y conducta alterada. El hecho de que c-Fos parece no ser requerido para la proliferación de la mayoría de las células *in vivo* hace cuestionar por que su expresión esta tan ligada al estímulo mitogénico. Una posible explicación podría ser que otras proteínas AP-1 compensan por la mayoría de las funciones de c-Fos, a excepción de aquellas que inducen defectos en los huesos, en la gametogénesis y en ciertas funciones neuronales. Ciertamente, se ha demostrado, a través de microinyecciones de anticuerpos específicos, que ninguna de las proteínas de la familia de Fos (c-Fos, FosB, Fra1 o Fra2) individualmente son esenciales para la proliferación celular, pero que la neutralización de las cuatro bloquea la proliferación celular (Piechaczyk y Blanchard, 1994).

### 3.3.4 Regulación de la expresión de *c-fos*

La expresión del proto-oncogen *fos* 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 ARNm 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* rata (Wang y Howells, 1994) (Figura 2) revela la presencia de un elemento de respuesta dependientes de cAMP (CREs) entre las posiciones -60 a -35 (respecto al sitio de inicio de la transcripción) el cual es requerido para la inducción por agonistas de la vía del adenilato ciclasa. Localizado entre las posiciones -308 a -289 está el 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 SRE 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 SRE. Otra proteína de 62 KDa también ha sido implicada en la unión a SRE ya que forma un complejo terciario con SRF. Inmediatamente hacia el extremo 3' de SRE, entre las posiciones -288 a -282, hay un sitio AP-1 capaz de unir los complejos Fos/Jun. El elemento inducible-*sis* (SIE) se encuentra entre las posiciones -341 a -327. A este sitio se une el factor inducible-*sis*, el cual se activa en respuesta al tratamiento con *c-sis*/PDGF. Una secuencia similar al elemento de respuesta a glucocorticoides (GRE) se encuentra entre las posiciones -268 a -254. La secuencia de la región 5' del gen de *c-fos* está altamente conservada: el gen de rata es 93 % idéntico al de ratón y 77 % idéntico al de humano. Se ha identificado en la región promotora del gen de *c-fos* de humano, entre la posición -1060 a -1300, 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', en la región entre -278 a -135, como en el 3' (Hyder *et al.*, 1991a; Hyder *et al.*, 1991b).



**Figura 2. Estructura del gen *c-fos* (rata).** Diagrama esquemático del gen de *c-fos* de rata (Wang y Howells, 1994), en el que se presenta la localización de elementos regulatorios AP-1, elemento de respuesta a la proteína activadora -1; CRE, elemento de respuesta a cAMP; GRE, elemento de respuesta a glucocorticoides; SIE, elemento inducible-*sis*, SRE, elemento de respuesta a suero; TATA, caja TATA.

### 3.3.5 Regulación de la expresión de proto-oncogenes por hormonas esteroideas

Uno de los principales efectos de los estrógenos sobre el útero y las glándulas mamarias en los mamíferos es la proliferación celular. Hasta el momento no se sabe con exactitud el mecanismo específico por medio del cual los

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

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 vía 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, en forma primaria y rápida, de proto-oncogenes que son inducidos comúnmente 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  $17\beta$ -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 ARNm 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 horas 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 18 horas 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). Este segundo pico se podría deber a la inducción tardía de estos proto-oncogenes por factores de crecimiento (Huet-Hudson *et al.*, 1990; Curtis *et al.*, 1996). 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<sub>2</sub> (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 E<sub>2</sub> se presenta un incremento notorio en el ARNm 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 incremento 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 ARNm 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 ARNm 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 ARNm 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 ARNm de los proto-oncogenes *c-fos*, *c-jun*, *jun-B* y *jun-D* por E<sub>2</sub> 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, aunado a los ensayos de "nuclear run-on transcription" (Weisz y Bresciani, 1988; Cicatiello *et al.*, 1992) indican que los efectos del E<sub>2</sub> sobre la expresión de estos proto-oncogenes ocurren a nivel transcripcional.

El incremento en los niveles del ARNm 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-específicos; se ha determinado que la expresión de estos proto-oncogenes no es inducida por E<sub>2</sub> 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 mientras que los estrógenos inducen la expresión de estos proto-oncogenes, en útero de ratas ovariectomizadas, otras hormonas como glucocorticoides, andrógenos o progesterona no inducen la expresión de estos genes (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)

La progesterona (P<sub>4</sub>) 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 P<sub>4</sub> reduce considerablemente los niveles del ARNm de *c-fos* inducido por E<sub>2</sub> y bloquea el efecto represivo del E<sub>2</sub> 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 E<sub>2</sub> + P<sub>4</sub> no altera la respuesta ni del útero completo ni del epitelio hacia el E<sub>2</sub>, esto es, la respuesta fue la misma que en las ratas tratadas solamente con E<sub>2</sub>. Esto plantea la posibilidad de que la acción antagonista de la P<sub>4</sub> en el crecimiento uterino estrógeno-inducida sea mediada, 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 EL GEN SUPRESOR DE TUMORES P53: MECANISMO DE ACCIÓN EN LA PROLIFERACIÓN Y MUERTE CELULAR

El mecanismo de acción de p53 en la proliferación y muerte celular se comenta extensamente en el artículo presente en el **Anexo 2**. A continuación se presenta un resumen de dicho artículo

#### 3.4.1 Estructura y función de p53

La proteína de *p53* es un factor de transcripción que aumenta la frecuencia de transcripción de diversos genes que participan en la reparación del ADN y/o muerte celular entre otros. La proteína humana de *p53* contiene 393 aminoácidos y ha sido dividida estructural y funcionalmente en cuatro dominios los cuales desempeñan un papel muy preciso. El extremo amino terminal contiene el dominio de activación de la transcripción, el cual interactúa con la maquinaria basal de la transcripción regulando positivamente la expresión de diferentes genes (*p21/Waf1*, *MDM2*, *GADD45*, *ciclina G*, *bax*, *PIGs* e *IGF-BP3* entre otros). Dos eventos de fosforilación de p53 en serinas son determinantes para la activación de esta proteína (Caspari, 2000). La fosforilación de la serina

20 por la proteína Chk2 (la cual es a su vez fosforilada por la cinasa ATM) induce la disociación de p53 de MDM2, evitando que sea transportada al citoplasma donde se degradada. La S15 es fosforilada por dos diferentes cinasas, ATM y ATR. Esta fosforilación induce la interacción con CBP/p300, la cual acetila varios residuos de lisina del extremo carboxilo terminal, como se explica más adelante.

El dominio de unión al ADN de p53 ocupa casi 2/4 partes de la proteína y se encuentra ubicado entre los residuos 102 a 292. La proteína tetramérica de p53 (dos dímeros) se une a cuatro repeticiones de una secuencia consenso del ADN: 5'-PuPuPuC(A/T)-3'. Esta secuencia se repite en dos pares, cada una arreglada como repeticiones inversas (Cho *et al.*, 1994).

La proteína nativa de p53 es un tetrámero en solución, y los residuos 324-355 son necesarios para la oligomerización de esta proteína. Se ha demostrado que la proteína de p53 requiere de un cambio estructural para activar su unión al ADN. La forma latente de p53, que no se une al ADN, se regula por el extremo carboxilo terminal que está compuesto por 29 aminoácidos, de los cuales nueve son básicos. La unión de p53 al ADN es activada por la fosforilación de los residuos S378 y S392 por la cinasa C y la caseína cinasa II respectivamente, o por la defosforilación del residuo S376, o la acetilación, por la proteína CBP/p300, de los residuos K373 y K382, o por la delección de este dominio carboxilo terminal básico y/o la unión del anticuerpo PAb421 a los residuos 370-378 (Jayaraman y Prives, 1995; Caspari, 2000). Estos datos han llevado a postular que el extremo carboxilo terminal determina la conversión de p53 entre formas que están inactivas y formas que están activas para su unión al ADN, en forma alosterica (Waterman *et al.*, 1995).



### 3.4.2 Inducción y activación de p53.

En condiciones normales, p53 es una proteína poco abundante ya que tiene una vida media corta (~ 20 minutos) y se encuentra de forma inactiva. La degradación de p53 esta mediada por MDM2 (Tao y Levine , 1999) y ocurre en el citoplasma, donde se ubiquitina y se degrada por la vía dependiente del proteasoma (Kubbutat *et al* , 1997) Las señales que activan p53 están mediadas por diversas situaciones de stress celular, como son diferentes tipos de daño al ADN incluyendo el rompimiento de la doble cadena del ADN por radiaciones  $\gamma$  y la presencia de intermediarios de reparación del ADN debido a radiación ultravioleta o agentes químicos, lo cual resulta en un incremento y activación de p53 en la célula. Los niveles de p53 son debidos en general al incremento de la vida media de la proteína y posiblemente también a la velocidad de síntesis (Ko y Prives, 1996) Aun se desconocen las proteínas involucradas en la vía de detección del daño al ADN y activación de p53

### 3.4.3 Regulación del ciclo celular y apoptosis por p53

Los efectos mediados por la inducción de p53 llevan a la inhibición de la progresión del ciclo celular o a la muerte celular. Ambos proveen mecanismos por medio del cual p53 funciona para controlar el daño al ADN, protegiendo a las células descendientes de la acumulación de mutaciones. Diversos experimentos han proporcionado información de las proteínas involucradas en ambas vías

La proteína p53 regula negativamente al ciclo celular en la transición de la fase G1 a la fase S por medio de p21. En la fase G1, las señales extracelulares de proliferación se transducen al núcleo y activan la maquinaria del ciclo celular. La vía de señalización mejor estudiada en esta fase es p16-ciclina D<sub>1</sub>-cdk4-Rb. El factor de transcripción E2F regula la expresión de diversos genes que se requieren en la fase S del ciclo celular. Rb en su estado de hipofosforilación bloquea la progresión del ciclo celular porque se une al factor de transcripción

E2F. El complejo ciclina D<sub>1</sub>-cdk4 fosforila a Rb, lo que libera al factor E2F y permite la progresión del ciclo celular. Algunas formas de daño al ADN inducen la activación de p53, el cual induce la transcripción de p21 (*Waf1/Cip-1*) (El-Deiry *et al.*, 1993). La proteína p21 inhibe la actividad cinasa del complejo ciclina D<sub>1</sub>-cdk4, lo cual permite la acumulación de Rb hipofosforilado. Por otra parte, se ha observado que p21 puede formar complejos con subunidades de E2F y de esta forma controla directamente la actividad de esta proteína por un mecanismo diferente a la vía descrita anteriormente (Delavaine y La Thangue, 1999). Otras formas por medio del cual p21 puede regular el ciclo celular es mediante la interacción con el factor de replicación y reparación PCNA (antígeno nuclear de proliferación celular). p21 inhibe la función de PCNA, bloqueando el paso de elongación en la replicación del ADN (Waga *et al.*, 1994). Así mismo, en algunas células en cultivo la sobreexpresión del gen GADD45 (gen inducido por p53) inhibe la progresión de ciclo en G1 (Kastan *et al.*, 1992). La proteína Gadd45 se une a PCNA e inhibe la entrada de las células a la fase S (Smith *et al.*, 1994).

p53 induce apoptosis en varios tipos celulares, particularmente en las células de la línea hematopoyética (Oren, 1994). Así mismo, diversos estímulos pueden causar apoptosis dependiente de p53, incluyendo daño al ADN (Lowe *et al.*, 1993a), expresión de oncogenes virales (i.e. E1A de adenovirus (Debbas y White, 1993) o E7 de papilomavirus (Howes *et al.*, 1994)), expresión de oncogenes celulares (i.e. myc (Wagner *et al.*, 1994)), pérdida de factores de crecimiento (Canman *et al.*, 1995), o de interleucinas (Gottlieb *et al.*, 1994), o por la pérdida de genes supresores de tumores (i.e. Rb (Wu y Levine, 1994)). Sin embargo, la inducción de apoptosis también puede ocurrir por vías independientes de p53 (Lowe *et al.*, 1993b).

p53 puede inducir apoptosis tanto por medio de su función transactivadora, así como por una actividad que no requiere de dicha función. Esto último se ha observado en varios tipos celulares, en donde la apoptosis mediada por p53 e iniciada por daño en el ADN ocurre en ausencia de síntesis

de ARN o proteínas (Caelles *et al.*, 1994) o en presencia de p53 con deficiente función transactivadora (Haupt *et al.*, 1995).

Entre los genes cuya expresión es regulada por p53 y que pueden influir en la decisión de entrar a una vía apoptótica se encuentran *IGF-BP3*, *bax*, *bcl-2*, *PIGs* (genes inducidos por p53), *Fas*, *FasL* y *DR5* (Receptor de muerte 5) (Miyashita *et al.*, 1994; Buckbinder *et al.*, 1995; Miyashita y Reed, 1995; Polyak *et al.*, 1997) Todos estos genes son inducidos por p53, a excepción de *bcl-2* que es inhibido (en algunos tipos celulares) La sobreexpresión de *bcl-2* puede bloquear la apoptosis inducida por p53. Bax se une a Bcl-2 y antagoniza su habilidad para bloquear la apoptosis. Así es que la síntesis de Bax y la inhibición de Bcl-2 dependientes de p53 induce la respuesta de la célula hacia apoptosis. Las proteínas que conforman la familia de Bax y Bcl-2 forman canales en la mitocondria, los cuales controlan la liberación del citocromo C, el cual es esencial para la activación de Apaf-1. El citocromo C se une a Apaf-1 en presencia de nucleótidos de adenina y esta unión produce un cambio conformacional que permite que la procaspasa-9 se una a este complejo. La subsecuente oligomerización de la procaspasa-9 facilita su autoactivación, la cual desencadena la cascada de activación de caspasas. Estas proteasas degradan diversas proteínas celulares, entre las que se encuentran proteínas estructurales, cinasa y proteínas relacionadas con el ciclo celular y la reparación del ADN, lo cual finalmente lleva a la apoptosis (Zou *et al.*, 1997; Sheikh y Fornace, 2000)

Los genes inducidos por p53 o *PIGs* son 13 genes involucrados en el control redox, y son activados antes de la apoptosis mediada por p53. Estos datos han llevado a postular el siguiente modelo: p53 induce transcripcionalmente la expresión de genes relacionados con el control redox (*PIGs*), lo que resulta en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). Estas ROS causan daño oxidativo a la mitocondria, lo cual activa la cascada de caspasas para inducir la apoptosis (Polyak *et al.*, 1997)

La proteína de unión al factor de crecimiento tipo insulina 3 (*IGF-BP3*) afecta el crecimiento y el gen que codifica para esta proteína también es regulada por p53. Al unirse esta proteína a IGF previene la interacción con su receptor (IGFR), bloqueando la vía de señalización de IGF que induce mitosis (Miyashita y Reed, 1995)

Fas y DR5 pertenecen a la familia del receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR). Estas proteínas se encuentran ubicadas en la membrana citoplasmática y contienen un dominio intracelular que es fundamental para la transducción de la señal apoptótica. Estos receptores son activados por un ligando; Fas es activado por FasL y DR5 por TRAIL (ligando que induce apoptosis relacionado con TNF). Estos receptores también se pueden activar en ausencia del ligando por la sobreexpresión del receptor. La activación del receptor, dependiente o independiente del ligando, induce la trimerización del receptor, lo cual induce el reclutamiento de proteínas adaptadoras intracelulares y la subsecuente activación de la cascada de caspasas (Sheikh y Fornace, 2000)

#### 4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se ha propuesto que los cambios en los niveles hormonales durante el ciclo estral de la rata regulan la proliferación y muerte celular en el epitelio uterino. Sin embargo, los datos de proliferación celular reportados hasta el momento no coinciden perfectamente entre sí y existen pocos datos en la literatura que describen la muerte celular en este tejido. Así mismo, se ha propuesto que uno de los primeros pasos mediante el cual los estrógenos inducen la replicación del ADN y la proliferación celular en el útero de las ratas ovariectomizadas (ovx) es mediante la inducción de la expresión de factores de transcripción, entre los cuales se encuentran los proto-oncogenes. Se ha demostrado que la expresión del proto-oncogen *c-fos* es inducida en el útero de las ratas ovariectomizadas poco tiempo después de la administración de  $17\beta$ -estradiol ( $E_2$ ). Sin embargo, no se ha estudiado si la expresión de *c-fos* es regulada por  $E_2$  durante el ciclo estral y si su expresión efectivamente se correlaciona con la proliferación celular en tejidos uterinos. En diversos modelos experimentales, se ha observado que p53 es uno de los genes involucrados en la regulación de la muerte celular, sin embargo, hasta el momento se desconoce si este gen se expresa en el útero de la rata y si lo hace de que manera se correlaciona con la regulación de la muerte celular en el epitelio uterino durante el ciclo estral.

## **5. OBJETIVOS GENERALES**

Estudiar el patrón de proliferación y apoptosis del epitelio uterino de la rata durante el ciclo estral y correlacionarlos con el patrón de expresión del proto-oncogen *c-fos* y del gen supresor de tumores *p53* en este órgano

### **5.1 OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Analizar el patrón de expresión del proto-oncogen *c-fos* y del gen supresor de tumores *p53* en los epitelios uterinos luminal (EL) y glandular (EG) de la rata durante el ciclo estral tanto al nivel transcripcional (ARNm) como traduccional (proteína)
2. Analizar el patrón de apoptosis del EL y EG del útero de la rata durante el ciclo estral y correlacionarlo con la expresión de *p53*
3. Analizar el patrón de proliferación del EL y EG del útero de la rata durante el ciclo estral y correlacionarlo con la expresión de *c-fos*
4. Analizar el patrón de expresión de las isoformas  $\alpha$  y  $\beta$  del receptor a estrógenos en el EL y EG del útero de la rata durante el ciclo estral y correlacionarlo con la expresión de *c-fos* y la proliferación celular

## 6.HIPÓTESIS DE TRABAJO

Se espera que la expresión del gen de *c-fos* se incremente en los tipos celulares del útero de la rata que presentan proliferación celular en las diferentes etapas del ciclo estral y que la expresión de *p53* se incremente en los tipos celulares que presenten muerte celular

## 7. MATERIAL Y METODOS

### 7.1 ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Se usaron ratas adultas de la cepa Long-Evans de 200-250 g, las cuales fueron mantenidas en un ciclo luz:oscuridad 14:10, con agua y comida *ad libitum*. Solamente se utilizaron ratas que presentaron por lo menos 3 ciclos estrales regulares de 4 días de duración, el cual fue determinado por medio de análisis microscópico de frotis vaginales diarios. Los animales se sacrificaron a las 13:00 hrs de cada uno de los días del ciclo. Inmediatamente después de sacrificar a los animales se obtuvo el útero

### 7.2 PROCESAMIENTO DEL TEJIDO

Los tejidos fueron fijados en paraformaldehído al 4% en PBS. Los tejidos que se usaron tanto para la hibridación *in situ* como para la inmunohistoquímica fueron fijados por 2 h, mientras que los que se usaron para la determinación del índice apoptótico fueron fijados por 24 h. Los tejidos fueron deshidratados, impregnados e incluidos en parafina. Se hicieron cortes de 4-5  $\mu\text{m}$  de grosor y se colocaron en laminillas Silane-Prep (Sigma) para hibridación *in situ*, laminillas tratadas con vectabond (Vector) para inmunohistoquímica, o laminillas tratadas con Poli-L-lisina (Sigma) para índice apoptótico

### 7.3 DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE APOPTÓTICO

Se llevo a cabo la técnica de TUNEL para determinar el índice apoptótico de cada tipo celular en las diferentes etapas del ciclo estral en cortes histológicos. Para ello se usó un estuche de detección *in situ* de muerte celular (Boehringer Mannheim) siguiendo las instrucciones del fabricante. Este estuche se basa en el marcaje de los extremos libres 3'-OH del ADN, los cuales se generan por la degradación del ADN durante la muerte celular, con un nucleótido modificado



(fluoresceína-dUTP) por medio de la enzima deoxinucleotidil transferasa terminal (TdT). El ADN marcado con dUTP-fluoresceína es detectado por medio de un anticuerpo anti-fluoresceína conjugado con peroxidasa. Posteriormente, la peroxidasa es detectada por su reacción con la diaminobencidina (DAB) y las células teñidas se analizan por medio de un microscopio de luz. El índice apoptótico fue estimado contando el número de células apoptóticas marcadas (usando el programa Metamorph Imaging System). Un total de 100 células fueron analizadas por cada tipo celular por cada sección. Tres secciones por animal fueron analizadas. N = 5 animales por día.

#### 7.4 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

Se observó la estructura de los diferentes tipos celulares por medio de microscopía electrónica de transmisión. Para ello se sacrificaron 2 ratas de cada uno de los días del ciclo y se extrajo el útero. El tejido se fijó con fijador de Karnovsky (Karnovsky, 1965) modificado y se procesó hasta su inclusión en Epón 812 según una técnica ya probada (Merchant-Larios *et al.*, 1993). Se hicieron cortes seriados alternando semifinos y finos de 1  $\mu\text{m}$  y 70 nm respectivamente. Los cortes semifinos se observaron al microscopio de luz después de teñirlos con azul de toluidina y los cortes finos se contrastaron con acetato de uranilo y plomo y se observaron en un microscopio electrónico (Jeol, Modelo JEM-1010), a un aumento de  $\times 2.5\text{K}$  a  $\times 15\text{K}$ .

#### 7.5 DETERMINACIÓN DE PROLIFERACIÓN CELULAR

Se llevó a cabo la determinación de la proliferación de cada tipo celular del útero de la rata en los diferentes días del ciclo estral por medio de la incorporación de 5-bromo-2'-deoxi-uridina (BrdU) al ADN. Para ello, se inyectaron a las ratas 5 mg/ 100 g de peso corporal de BrdU intraperitonealmente 2 h antes de sacrificar al animal. Los animales se sacrificaron a las 13:00 h e inmediatamente se obtuvo el útero. Este se procesó para llevar a cabo cortes en congelación de 16  $\mu\text{m}$  de

grosor y se montaron en laminillas tratadas con poli-L-lisina. El tejido fue fijado con etanol ácido (50 mM glicina en 70% etanol pH 2) e incubado con el anticuerpo monoclonal anti-BrdU. La preparación del anticuerpo contiene nucleasas específicas que permiten el acceso del anticuerpo a la BrdU incorporada al ADN. Después de incubar con el anticuerpo secundario anti-ratón-Ig-rodaminado, las células marcadas se observaron en un microscopio de fluorescencia (Nikon, Modelo HSX-DX). Se cuantificó la cantidad de núcleos marcados en el epitelio luminal y en el epitelio glandular en cada una de las etapas del ciclo estral. Se analizaron todos los núcleos de los epitelios luminales y glandulares de cada corte y se cuantificó el número de núcleos positivos. N = 5 animales por día.

## 7.6 PREPARACIÓN DE PLÁSMIDOS

Se llevó a cabo la preparación de los plásmidos, que contenían el ADNc de *c-fos* y *p53*, usando un método de purificación en columnas (Qiagen). Para ello se cultivaron 25 ml de medio líquido LB con las bacterias de *E. coli* DH5 $\alpha$  que previamente se habían transformado con los plásmidos respectivos. Para obtener los plásmidos, las bacterias se lisaron en medio alcalino (0.2 N NaOH, 1% SDS) y se neutralizaron (3 M acetato de potasio, 2 M ácido acético glacial). Finalmente, se purificaron por medio de columnas (Qiagen). Para verificar los plásmidos se hizo un mapa de restricción. El ADNc de *p53*, que estaba inserto en el plásmido Bluescript (Stratagene), fue digerido con *Stu* I o con *Eco* RI/*Bgl* II. El ADNc de *c-fos*, que estaba inserto en el plásmido pSp65 (Promega), fue digerido con la enzima *Pvu* II.

## 7.7 TRANSCRIPCIÓN IN VITRO

Se obtuvo el ARNc marcado con digoxigenina-11-UTP por medio de un estuche de transcripción *in vitro* con SP6, T3 o T7 ARN polimerasa (Boehringer Mannheim) según las instrucciones del fabricante. El molde de ADN de *p53* (Soussi *et al.*, 1988) y de *c-fos* (Curran *et al.*, 1987) de rata se encuentran clonados

en la región del poly-linker de los plásmido Bluescript+ y pSp65, respectivamente. Después de linearizarlos en un sitio adecuado, el ARN se transcribió en la presencia de digoxigenina-11-UTP. Para obtener la sonda antisentido de *p53* se digirió el plásmido en el que estaba inserto el ADNc con *Stu I* y se transcribió con T3, y la sonda sentido se obtuvo digiriendo el plásmido con *Kpn I* y transcribiendo con T7. En el caso de *c-fos*, la sonda antisentido se obtuvo digiriendo el plásmido *c-fos* 1B con *Sal I* y transcribiendo con SP6. La sonda sentido se obtuvo digiriendo el plásmido *c-fos* 1A con *Pvu II* y transcribiendo con SP6. La eficiencia de cada transcripción se determinó por medio de dot blot comparándola con el control marcado que proporciona el estuche de transcripción. Así mismo, se llevó a cabo una hibridación en dot blot para lo cual se usaron ARNs extraídos de útero de rata en diferentes días del ciclo estral.

## 7.8 HIBRIDACIÓN *IN SITU*

Los cortes histológicos que previamente se habían colocado en laminillas silane-prep (Sigma), se desparafinaron y se rehidrataron. Se llevó a cabo un rompimiento de ribosomas con HCl 0.2 N, se permeabilizó con proteinasa K (1 µg/ml) y se acetiló con trietanolamina - anhídrido acético. Se equilibraron las muestras con solución de equilibrio (formamida 50%, NaCl 0.6 M, Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, DTT 10 mM y heparina 50 mg/ml), se prehibridaron con amortiguador de prehibridación (50% formamida, 4 X SSC (NaCl 0.6 M, citrato de sodio 0.06 M), 1 X solución de Denhardt (Ficoll tipo 400 0.02 %, polivinilpirrolidona 0.02 %, albúmina sérica bovina 0.02 %), 0.5 mg/ml ADN esperma de salmón, 0.25 mg/ml ARNt, 10% dextrán sulfato) por 1 h a temperatura ambiente y se hibridaron con los ARNc marcados con digoxigenina (30 ng/µl) por 18 h a 52 ° C (*c-fos*) o 57 ° C (*p53*). Una vez terminada la hibridación las muestras se lavaron con SSC 2 X, 1 X y 0.5 X. La detección de los híbridos marcados con digoxigenina se desarrolló mediante un estuche de detección de ácidos nucleicos marcados con digoxigenina (Boehringer Mannheim) siguiendo las instrucciones del fabricante. Este consiste en la detección de ácidos nucleicos marcados con digoxigenina por medio de un

anticuerpo conjugado anti- digoxigenina -fosfatasa alcalina y el substrato rojo permanente, el cual produce un precipitado rojo. Los núcleos se contratiñeron con hematoxilina. Se empleó un microscopio de luz para la observación de los campos microscópicos. Se analizó el epitelio luminal y glandular con la ayuda del programa Metamorph Imaging System para determinar la intensidad de la marca (valor promedio de gris) presente en el citoplasma de las células inmunopositivas. La intensidad de gris fue convertido a valor numérico usando la escala de 0 (blanco) a 255 (negro). La intensidad del fondo fue determinada de las secciones incubadas con la sonda sentido. El valor del fondo se resto a los valores obtenidos con la sonda antisentido. Un total de 100 células fueron analizadas por cada tipo celular por cada sección. Tres secciones por animal fueron analizadas. N=5 animales por día.

## 7.9 INMUNOHISTOQUÍMICA

Los cortes histológicos que previamente se habían colocado en laminillas tratadas con vectabond, se desparafinaron y se rehidrataron. Se llevó a cabo la recuperación del antígeno hirviendo los cortes en citrato de sodio 10 mM pH 6. Se bloqueó la peroxidasa endógena con  $H_2O_2$  al 3% y se permeabilizó con trítón X-100 al 0.5%. Se bloqueo con albúmina 5% -  $H_2O_2$  1% y posteriormente se incubó con el anticuerpo primario policlonal anti-Fos, anti-p53, anti-RE $\alpha$  o anti- RE $\beta$  (c-Fos: sc-52, p53: sc-1312, RE $\alpha$ : sc-542, RE $\beta$ : sc-6821; Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA) por 24 h a 4 ° C. Para el control negativo, se omitió el anticuerpo primario. Se incubó con el anticuerpo secundario biotinilado por 2 h y después con el complejo avidina-biotina por 1 h. La reacción se reveló con diaminobencidina y se contratiñó con hematoxilina. Las células marcadas se observaron en un microscopio de luz. Se cuantificó la cantidad de núcleos inmunopositivos en el epitelio luminal y en el epitelio glandular en cada una de las etapas del ciclo estral con la ayuda del programa MetaMorph Imaging System. Se analizaron todos los núcleos de los epitelios luminales y glandulares de cada corte. N = 5 animales por día. Se le asignó los siguientes valores a la intensidad de la

tinción: (0) ausente; (1) debil; (2) moderada; (3) intensa Se calculó el puntaje histológico (HSCORE) de la siguiente forma:  $HSCORE = \sum P_i (i+1)$ , donde  $i = 0, 1, 2, \text{ o } 3$  y  $P_i$  es el porcentaje de cada intensidad, de 0% a 100% (Lessey et al, 1988)

#### 7.10 CUANTIFICACIÓN HORMONAL

Se llevó a cabo la cuantificación del nivel hormonal en plasma sanguíneo por radioinmunoanálisis (RIA) (Abraham, 1975) Se cuantificaron los niveles de estradiol y progesterona de grupos de 5 animales sacrificados a las 13:00 h de cada uno de los días del ciclo. La sensibilidad del ensayo fue de 5.4 pg/ml para el estradiol y de 8.3 ng/ml para la progesterona. Los coeficientes de variación intra e interensayo fueron de  $5.3 \pm 8\%$  y  $6.5 \pm 10\%$  respectivamente.

#### 7.11 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

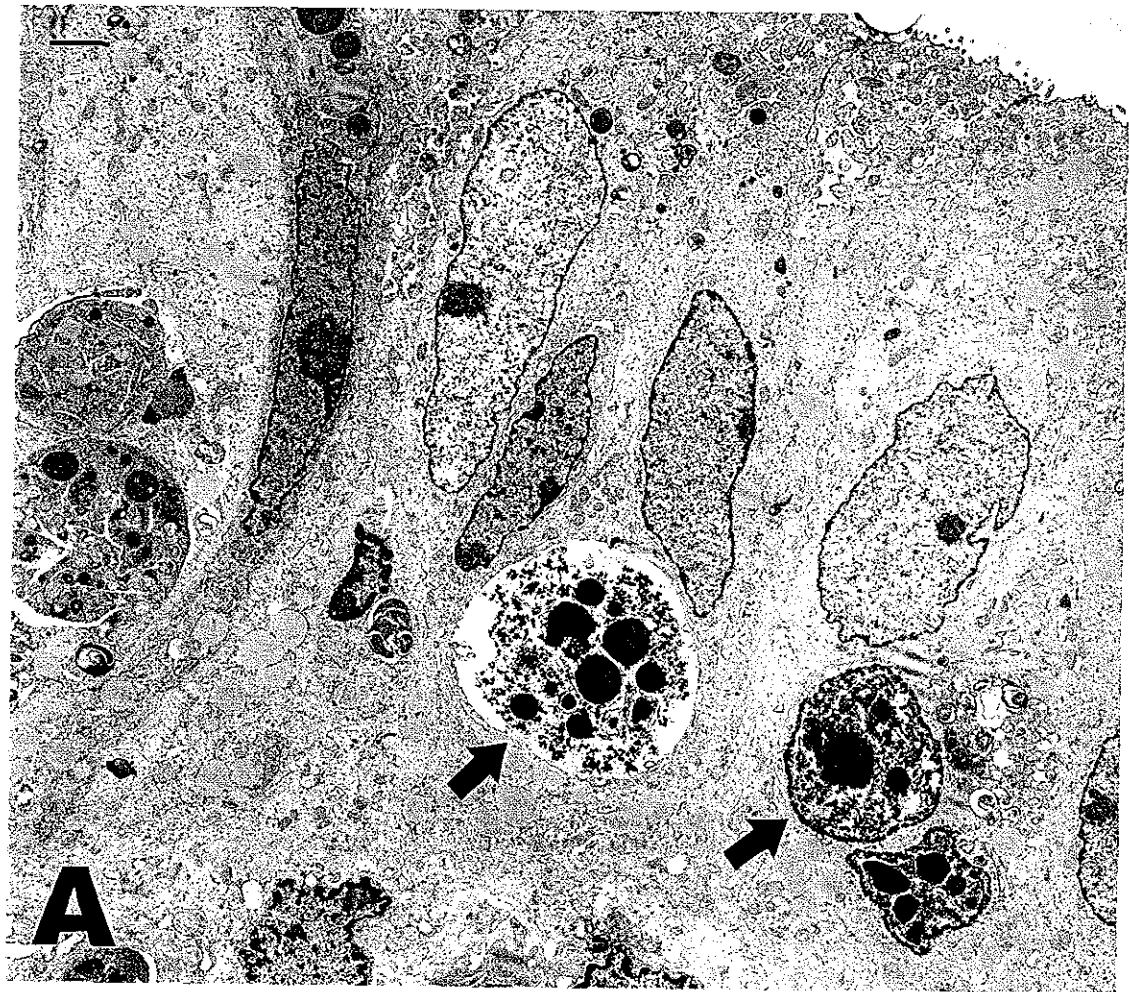
Los datos de TUNEL, proliferación, hibridación in situ, inmunohistoquímica y radioinmunoensayo fueron evaluados por medio de análisis de varianza de una sola vía (ANOVA) seguida por una prueba de comparación múltiple de Tukey. Se usó el programa Prism 2.01 para calcular los valores de probabilidad y los errores estándar de la media ( $\pm$ ESM)

## 8.RESULTADOS

### 8.1 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

Con el objeto de determinar las características que presentan las células muertas se observó la estructura de los diferentes tipos celulares por medio de microscopía electrónica. Las características principales que presentan las células que mueren por apoptosis son: la cromatina se condensa formando agregados cerca de la membrana nuclear, la cual se convoluciona, mientras que los nucleolos se agrandan. Las células se encojen y la membrana celular presenta protuberancias. Los organelos mantienen una apariencia normal salvo por la dilatación del retículo endoplásmico y la hinchazón de las mitocondrias. Las células apoptóticas son fagocitadas por células vecinas o por macrófagos (Zörnig *et al*, 2001). En el útero de la rata se observaron células muertas en el epitelio glandular y en el epitelio luminal durante el estro (Fig 3). Durante el metaestro, las células muertas se observaron principalmente en el epitelio luminal (Fig 3). Entre las principales características de estas células en proceso de apoptosis se observó que presentaron condensación de la cromatina, formación de cuerpos apoptóticos, y se observó que son fagocitadas por células epiteliales adyacentes y/ o por macrófagos. Durante el diestro también se observaron células muertas en el epitelio glandular, pero en menor proporción que durante el estro. Estas células presentaron las mismas características antes mencionadas. Durante el proestro, prácticamente no se observaron células apoptóticas.

**Figura 3. (Siguiendo hoja) Microscopía electrónica del epitelio luminal (A) y glandular (B) del útero de la rata durante el día del metaestro y estro, respectivamente.** Las flechas indican cuerpos apoptóticos en diversos estadios de digestión con vacuolas fagocíticas. Barra = 2  $\mu$ m



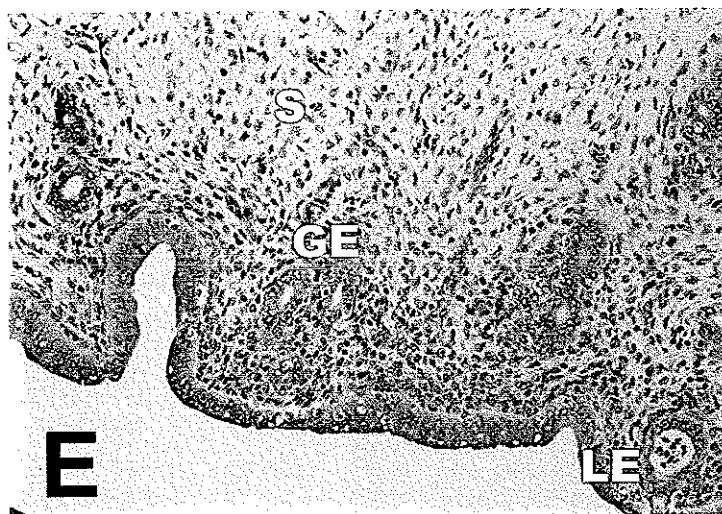
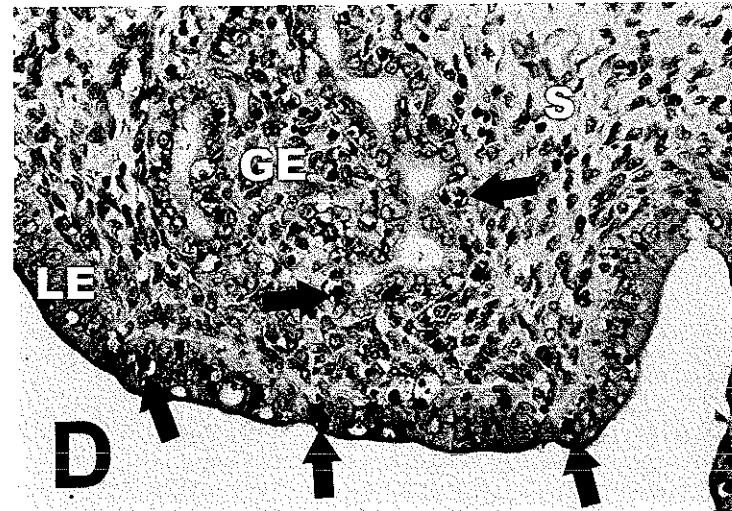
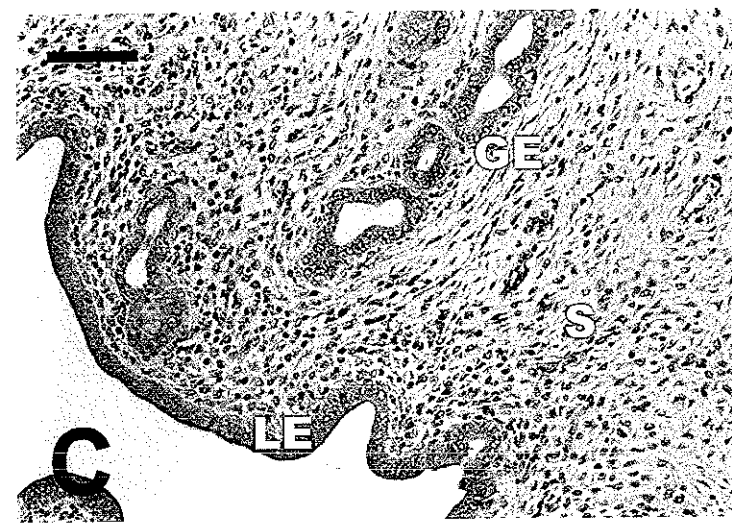
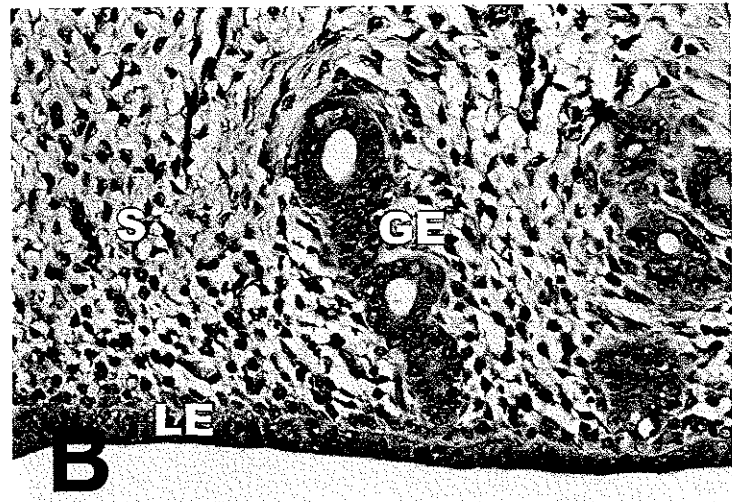
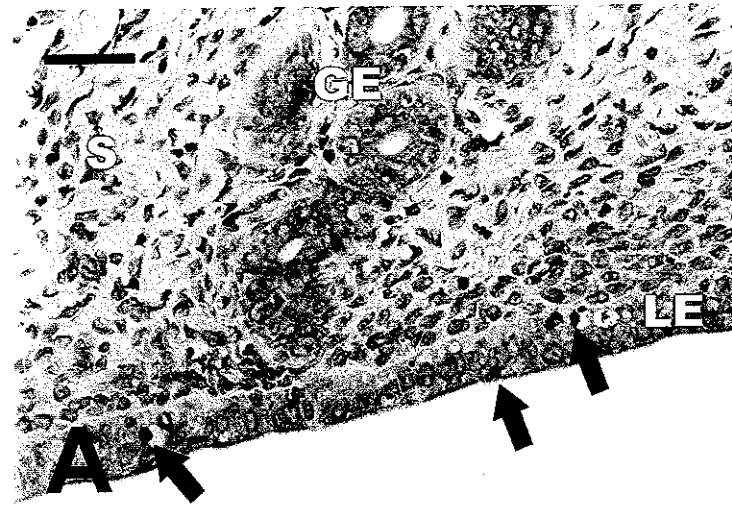
TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## 8.2 CUANTIFICACIÓN DEL ÍNDICE APOPTÓTICO

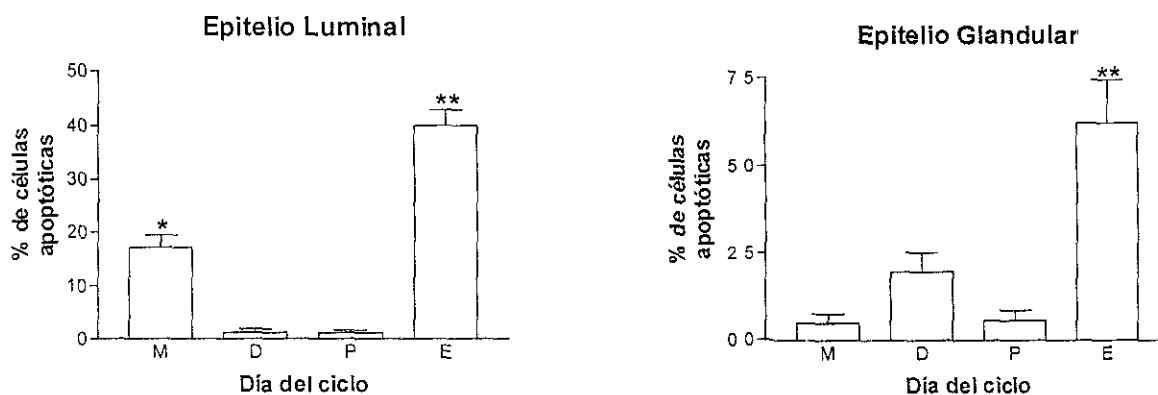
Para cuantificar el porcentaje de células muertas en cada tipo celular del útero se usaron úteros de ratas en los diferentes días del ciclo estral. Los úteros se fijaron con paraformaldehído, se incluyeron en parafina y se procesaron con un estuche para detección *in situ* de muerte celular - POD (Boehringer Mannheim), revelando finalmente la reacción con DAB. De los úteros de los animales sacrificados a las 13:00 h, en la etapa en la que se observó un mayor número de células muertas tanto en el epitelio luminal como en el epitelio glandular fue durante el estro (Fig. 4). Durante el metaestro también se observaron células muertas en el epitelio luminal y muy pocas en el epitelio glandular. En cambio, en las etapas de diestro y proestro se observaron muy pocas células muertas en ambos epitelios. Se cuantificó el porcentaje de células positivas a la reacción de TUNEL en el epitelio luminal y glandular en cada una de las etapas del ciclo con la ayuda del programa MetaMorph Imaging System. Los resultados de la cuantificación se presentan en la figura 5.

**Figura 4. (Siguiendo hoja) Apoptosis del epitelio uterino durante el ciclo estral determinado por el método de TUNEL.** Se muestra un ensayo representativo de cada día del ciclo: A) metaestro, B) diestro, C) proestro, D) estro, E) control negativo, es un corte seriado del tejido durante el día del estro (se omitió la enzima TdT). Las flechas indican células positivas a la reacción de TUNEL. Barra = 25  $\mu\text{m}$  en A, B, y D. En C y E barra = 50  $\mu\text{m}$ . LE, epitelio luminal; GE, epitelio glandular; S, estroma.





TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



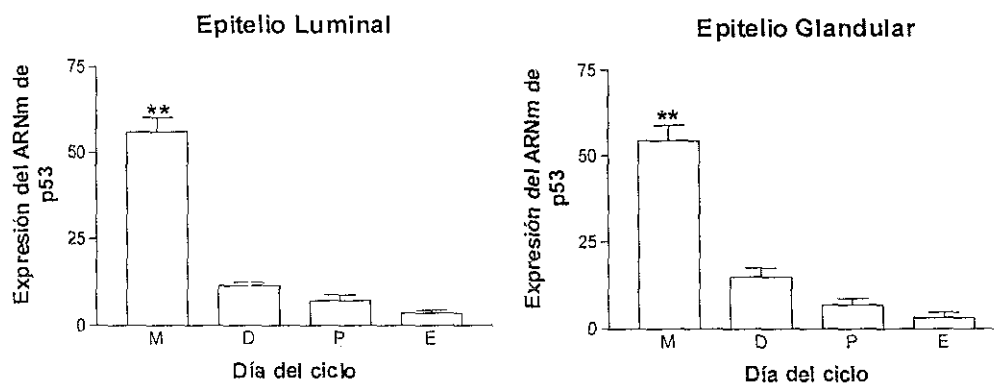
**Figura 5. Apoptosis en el epitelio uterino durante el ciclo estral.** Se llevó a cabo la reacción de TUNEL en el útero de 5 animales diferentes en cada día del ciclo para determinar el número de células muertas en el epitelio luminal y glandular. M, metaestro; D, diestro; P, proestro; E, estro. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  ESM. En el epitelio luminal: \*\* $p < 0.001$  comparado con los otros días del ciclo \* $p < 0.01$  comparado con D y P. En el epitelio glandular: \*\* $p < 0.001$  comparado con M y P y  $p < 0.01$  comparado con D.

### 8.3 EVALUACIÓN DEL ARNm DE *p53* POR HIBRIDACIÓN *IN SITU*

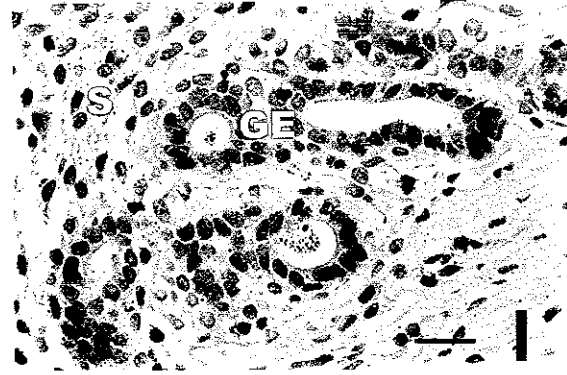
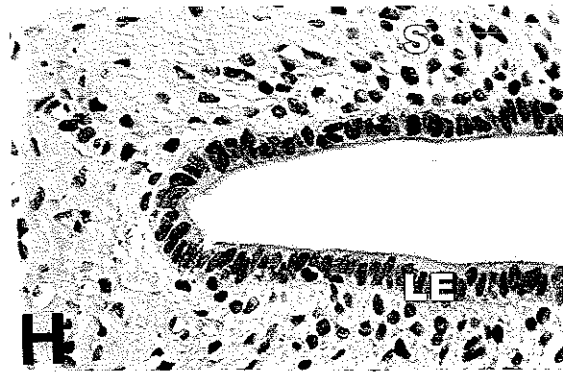
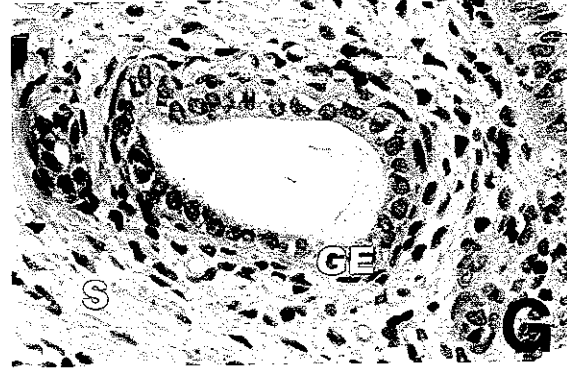
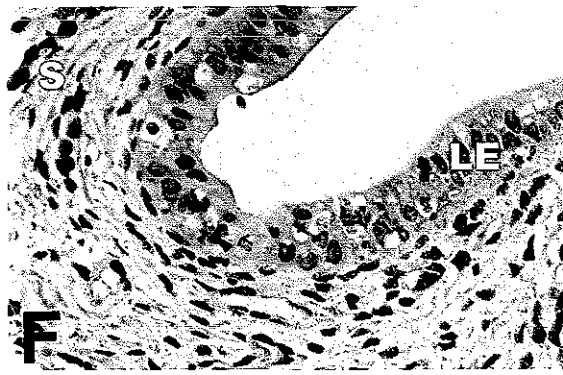
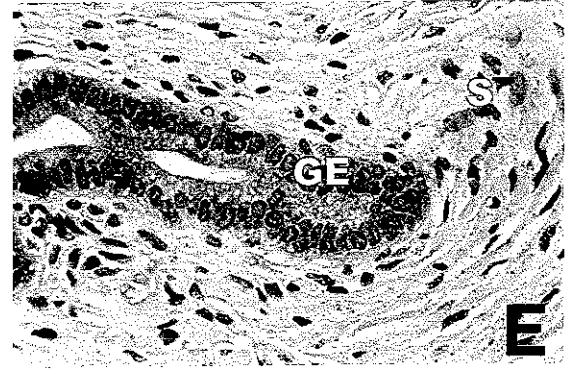
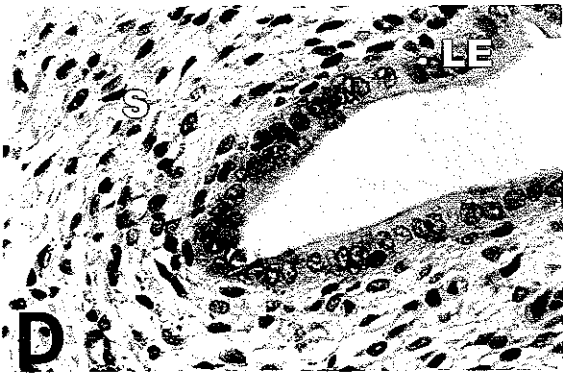
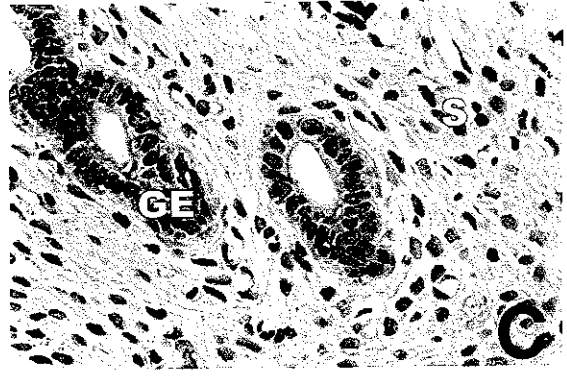
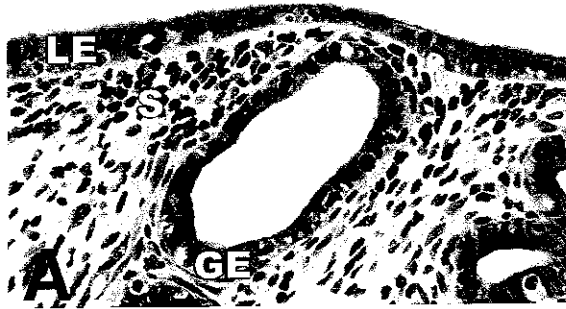
Para evaluar si *p53* está involucrada en la regulación de la muerte celular en los epitelios uterinos durante el ciclo estral, se detectó la presencia tanto del ARNm como de la proteína de *p53* en el epitelio luminal y glandular del útero durante los diferentes días del ciclo. Para detectar el ARNm de *p53* en los epitelios uterinos se procesaron los úteros de las ratas en los diferentes días del ciclo por medio de la técnica de hibridación *in situ*. Las células inmunopositivas se revelaron con el colorante rojo permanente y los núcleos se contratiñeron con hematoxilina. La intensidad de la tinción citoplasmática se cuantificó con la ayuda del programa Metamorph Imaging System. Se observó que el ARNm de *p53* se encuentra presente en el citoplasma de las células del epitelio luminal y del epitelio glandular.

en todos los días del ciclo estral, sin embargo, se observó, en forma muy marcada, un mayor contenido del ARNm, tanto en el epitelio luminal como glandular, en el día del metaestro y este disminuyó a lo largo del ciclo hasta llegar a su nivel más bajo en el día del estro (Fig 6 y 7)

**Figura 6. (Siguiente hoja) Expresión del ARNm de p53 en el útero de la rata durante el ciclo estral analizado por hibridación in situ.** Se muestra una hibridación in situ representativa de cada uno de los días del ciclo: A) metaestro; B) y C) diestro; D) y E) proestro; F) y G) estro; H) e I) control negativo (es un corte seriado del útero de rata en metaestro hibridado con la sonda sentido) En A) se observa tanto el epitelio luminal como el glandular B), D), F) y H) muestran el epitelio luminal C), E), G) e I) muestran el epitelio glandular Barra = 25  $\mu$ m LE, epitelio luminal; GE, epitelio glandular; S, estroma



**Figura 7. Expresión del ARNm de p53 en el epitelio uterino de la rata durante el ciclo estral.** Se llevó a cabo la hibridación in situ en el útero de 5 animales diferentes en cada día del ciclo para determinar el contenido de ARNm de p53. Se evaluó la intensidad de la tinción (valor promedio en la escala de grises) M, metaestro; D, diestro; P, proestro; E, estro Los resultados se expresan como la media  $\pm$  ESM \*\*p< 0 001 comparado con los otros días del ciclo

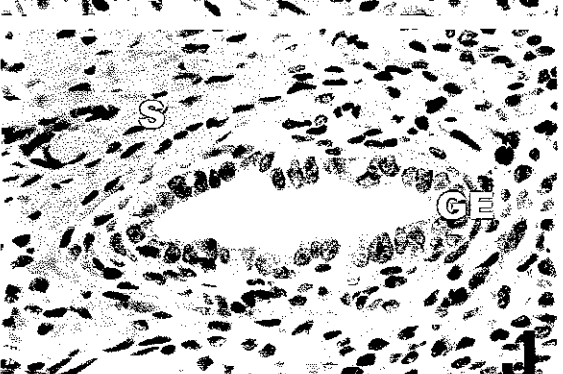
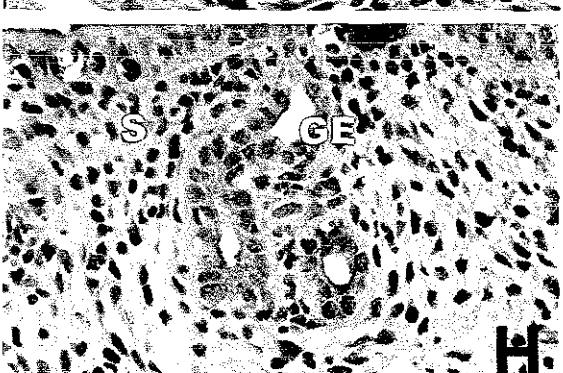
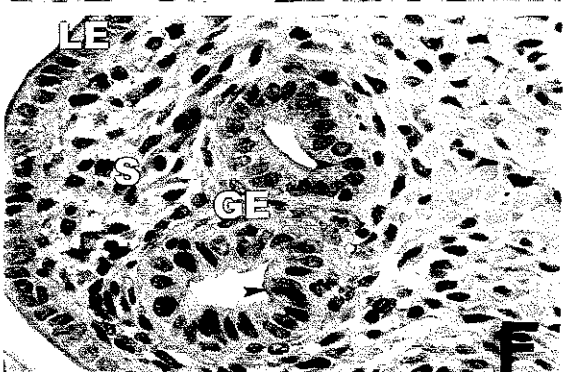
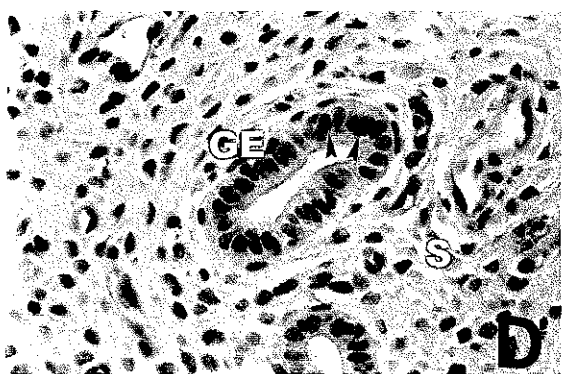
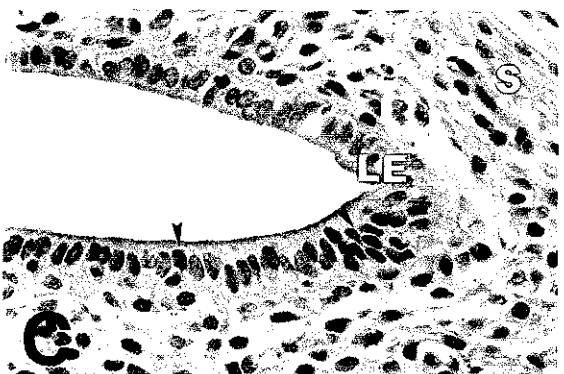
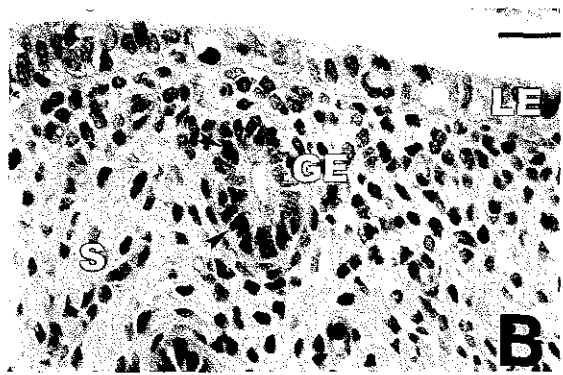
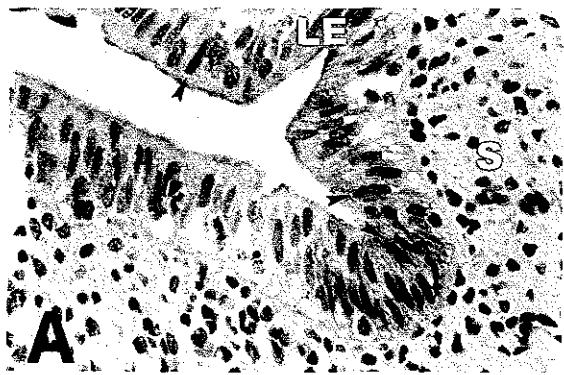


TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

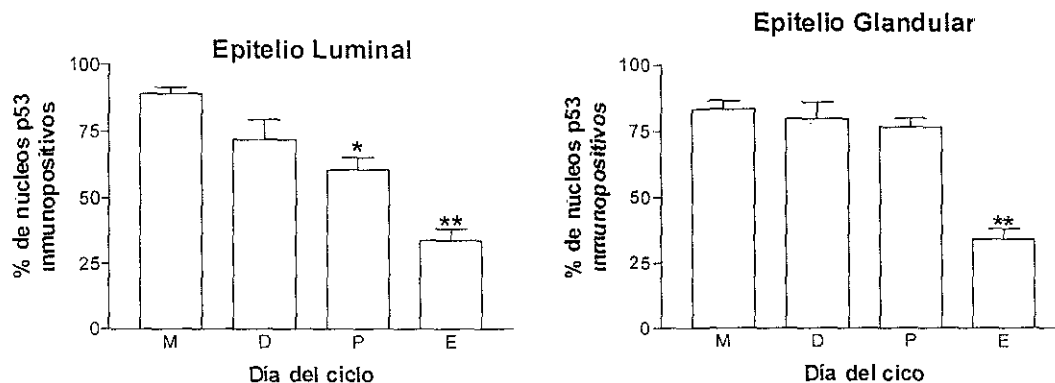
#### 8.4 EVALUACIÓN DE LA PROTEÍNA DE P53 POR INMUNOHISTOQUÍMICA

La proteína p53 se detectó por inmunohistoquímica (Fig. 8) La inmunoreactividad para p53 se detectó en el núcleo de las células epiteliales durante los días del metaestro, diestro y proestro. En el día del estro, la inmunoreactividad para p53 fue detectada predominantemente en el citoplasma de las células epiteliales. La mayor cantidad de núcleos inmunopositivos para p53 fueron detectados, en ambos epitelios, en el día del metaestro. En el epitelio luminal, el número de núcleos inmunopositivos disminuyó en los siguientes días del ciclo estral, y se observó el valor más bajo en el día del estro, que es cuando se presenta la mayor muerte celular en ambos epitelios. En el epitelio glandular el número de núcleos inmunopositivos fue similar durante los días del metaestro, diestro y proestro y disminuyó significativamente durante el día del estro (Fig. 9)

**Figura 8. (Siguiete hoja) Localización de la proteína p53 por inmunohistoquímica en el útero de la rata durante el ciclo estral.** Se presenta una inmunohistoquímica representativa de cada uno de los días del ciclo: A) y B) metaestro; C) y D) diestro; E) y F) proestro; G) y H) estro; I) y J) controles negativos (son cortes seriados del útero de rata en metaestro en el cual se omitió el anticuerpo primario) A), C), E), G) e I) muestran el epitelio luminal B), D), F), H) y J) muestran el epitelio glandular. Las cabezas de flecha indican núcleos con tinción positiva a p53 Barra = 25µm LE, epitelio luminal; GE, epitelio glandular; S, estroma



TESIS CON FALLA DE ORIGEN



**Figura 9. Nivel de expresión de la proteína p53 en el epitelio uterino durante el ciclo estral.** Se realizó la inmunohistoquímica de p53 en el útero de 5 diferentes animales por cada día del ciclo estral y se determinó el número de núcleos inmunopositivos en el epitelio luminal y en el glandular M, metaestro; D, diestro; P, proestro; E, estro. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  ESM. En el epitelio luminal: \*\* $p < 0.001$  comparado con M y D, y  $p < 0.05$  comparado con P; \* $p < 0.01$  comparado con M. En el epitelio glandular: \*\* $p < 0.001$  comparado con los otros días del ciclo.

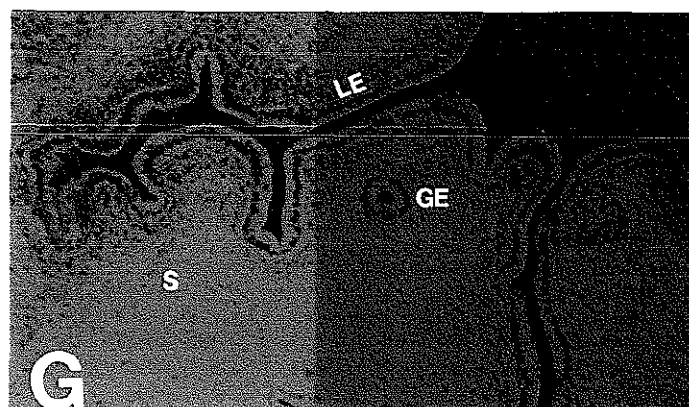
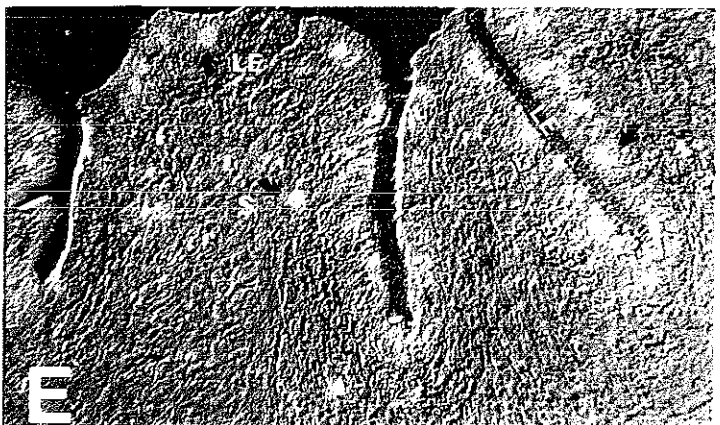
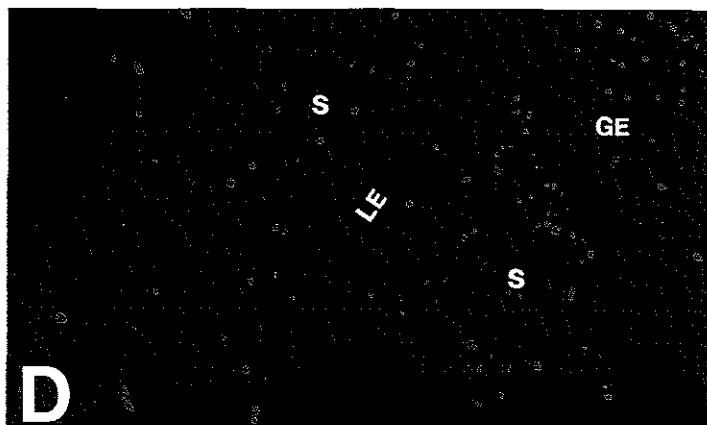
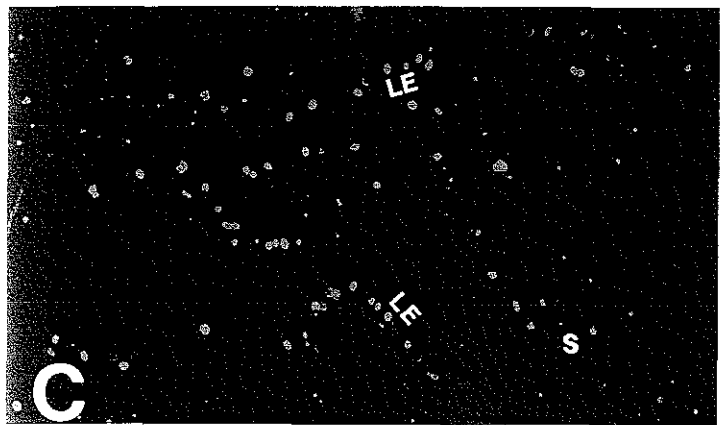
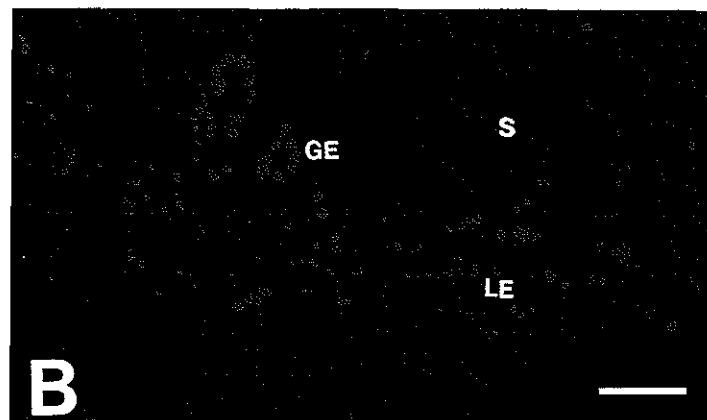
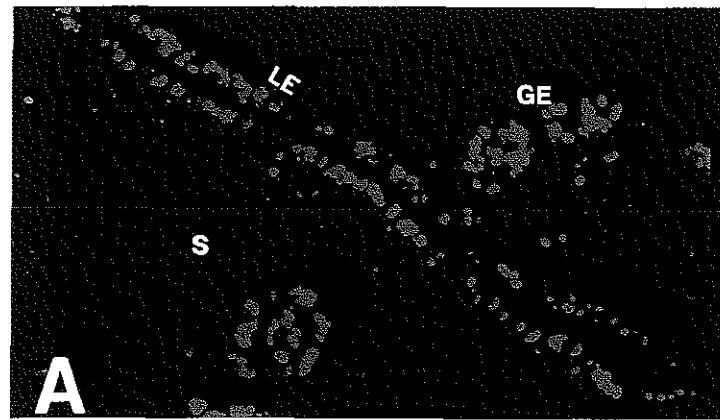
## 8.5 EVALUACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR

Con el objeto de determinar la etapa del ciclo en la cual proliferan cada uno de los epitelios uterinos se usó la incorporación de BrdU al ADN de las células que se encuentran en la fase S del ciclo celular. La BrdU incorporada se detectó por medio de un anticuerpo acoplado a rodamina. Los núcleos marcados se observaron en un microscopio de fluorescencia. En las etapas de metaestro y diestro se observó una intensa actividad proliferativa tanto en el epitelio luminal como en el epitelio glandular (Figs 10 y 11). Sin embargo, durante el proestro solamente el epitelio luminal presentó una alta actividad proliferativa, mientras que en el epitelio glandular disminuyó significativamente el número de núcleos positivos. Así mismo, se observaron en esta etapa algunas células en proliferación.

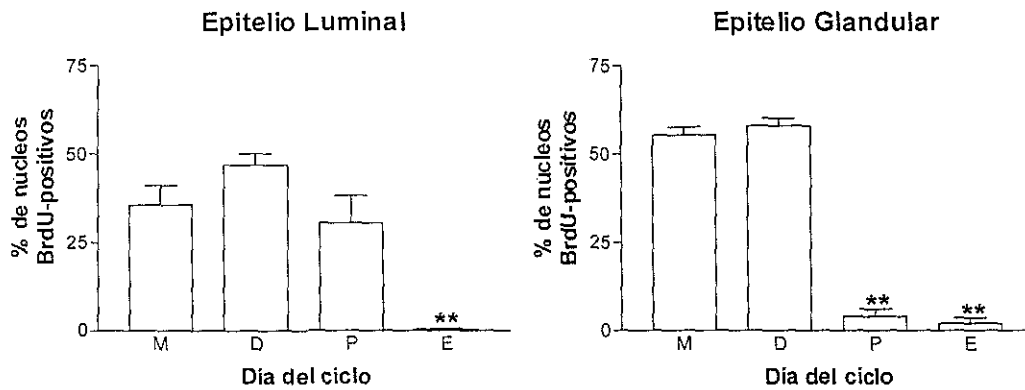
en el estroma y en el miometrio. En la etapa de estro se observaron pocos núcleos positivos en ambos epitelios, lo que indica que en esta etapa ambos epitelios presentan su mínima actividad proliferativa. En cambio, el estroma presentó una alta actividad proliferativa en esta etapa del ciclo estral.

**Figura 10. (Siguiendo hoja) Se utilizó la incorporación de BrdU para determinar la proliferación del epitelio uterino de la rata en cada día del ciclo estral.** La BrdU incorporada se detectó con un anticuerpo anti-BrdU, y este a su vez se detectó con un anticuerpo secundario rodaminado. Las células marcadas se observaron en un microscopio de fluorescencia. En el día del metaestro (A) y del diestro (B) el epitelio luminal y el glandular presentan proliferación. En el día del proestro (C y E), el epitelio luminal y el estroma presentan proliferación, mientras que en el día del estro (D y F) el estroma es el único tipo celular que prolifera. (G) Control negativo (es un corte seriado del tejido en el día del proestro en el que se omitió el anticuerpo). En E y F se observa una exposición doble con fluorescencia y con óptica de Nomarski, las flechas indican núcleos positivos para la incorporación de BrdU. Barra = 100  $\mu\text{m}$  en A, B, C, D y G. En E y F barra = 50  $\mu\text{m}$ . LE, epitelio luminal; GE, epitelio glandular; S, estroma.





TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



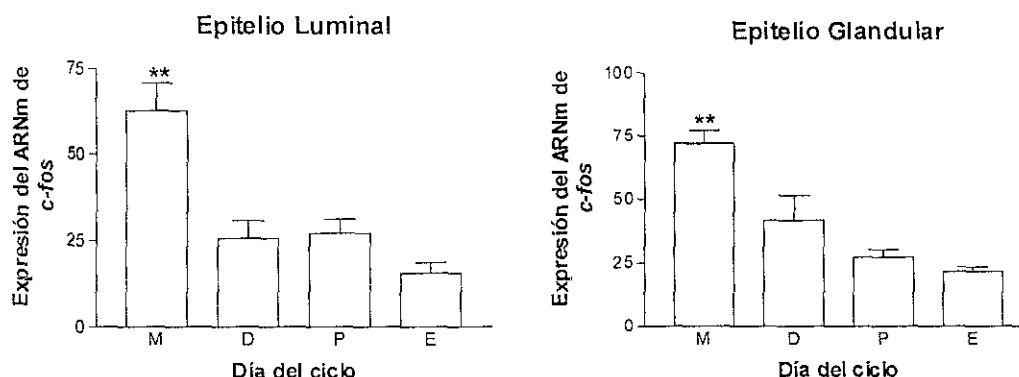
**Figura 11. Cuantificación de la incorporación de BrdU en el epitelio uterino durante el ciclo estral.** Se cuantificaron los núcleos inmunofluorescentes en el epitelio luminal y glandular del útero de 5 animales diferentes por cada día del ciclo M, metaestro; D, diestro; P, proestro; E, estro. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  ESM. En el epitelio luminal: \*\* $p < 0.001$  comparado con D,  $p < 0.01$  comparado con M y  $p < 0.05$  comparado con P. En el epitelio glandular: \*\* $p < 0.001$  comparado con M y D.

## 8.6 EVALUACIÓN DEL ARNm DE *C-FOS* POR HIBRIDACIÓN *IN SITU*

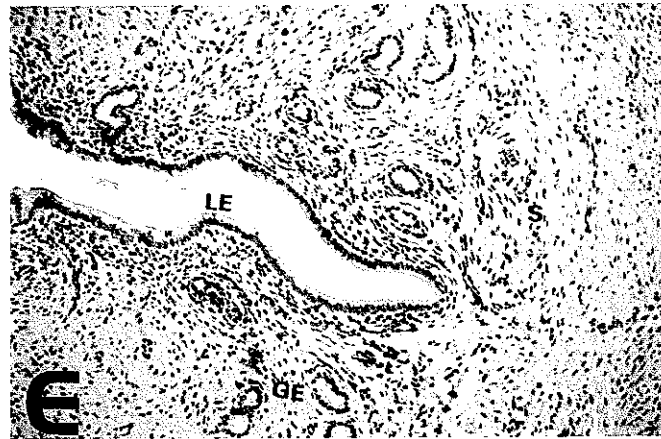
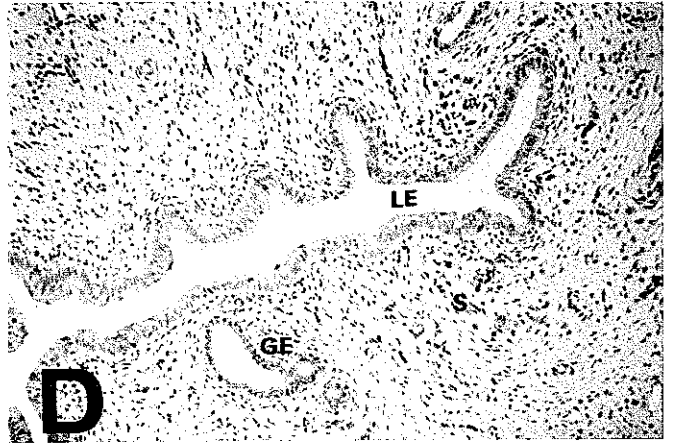
Para evaluar si *c-fos* está relacionado con la proliferación de los epitelios uterinos durante el ciclo estral, se detectó la presencia tanto del ARNm como de la proteína de *c-fos* en el epitelio luminal y el epitelio glandular del útero durante los diferentes días del ciclo. Para detectar el ARNm de *c-fos* en los epitelios uterinos se procesaron los úteros de las ratas en los diferentes días del ciclo por medio de la técnica de hibridación *in situ*. Las células inmunopositivas se revelaron con el colorante rojo permanente y los núcleos se contratiñeron con hematoxilina. La intensidad de la tinción citoplasmática se cuantificó con la ayuda del programa Metamorph Imaging System. El ARNm de *c-fos* se observó en el citoplasma de las células del epitelio luminal y del epitelio glandular en todos los días del ciclo estral. Sin embargo, se observó un mayor contenido del ARNm, tanto en epitelio luminal

como glandular, en el día del metaestro y este disminuyó a lo largo del ciclo hasta llegar a sus niveles más bajos en el día del estro (Figs. 12 y 13) Así mismo, se detectó la presencia de este ARNm en el miometrio (tanto circular como longitudinal) en todas las etapas del ciclo. En el miometrio longitudinal, la mayor concentración se detectó en el metaestro y en el miometrio circular en el proestro. En ambos miometrios la concentración disminuyó en el diestro, aumentó en el proestro y disminuyó en el estro. En el estroma periluminal, también se detectó la presencia de este mensajero. Esta fue más evidente en la etapa del diestro.

**Figura 12. (Siguiendo hoja) Expresión del ARNm de *c-fos* en el útero de la rata durante el ciclo estral analizado por hibridación in situ.** Se muestra una hibridación in situ representativa de cada uno de los días del ciclo: A) metaestro; B) diestro; C) proestro; D) estro; E) control negativo (es un corte seriado del útero de rata en metaestro hibridado con la sonda sentido). Barra = 100  $\mu$ m. LE, epitelio luminal; GE, epitelio glandular; S, estroma.



**Figura 13. Expresión del ARNm de *c-fos* en el epitelio uterino durante el ciclo estral.** Se llevó a cabo la hibridación in situ en el útero de 5 animales diferentes por cada día del ciclo para determinar el contenido de ARNm de *c-fos*. Se evaluó la intensidad de la tinción (valor promedio en la escala de grises). M, metaestro; D, diestro; P, proestro; E, estro. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  ESM. En el epitelio luminal: \*\* $p < 0.001$  comparado con D y E y  $p < 0.01$  comparado con P. En el epitelio glandular: \*\* $p < 0.001$  comparado con P y E y  $p < 0.05$  comparado con D.

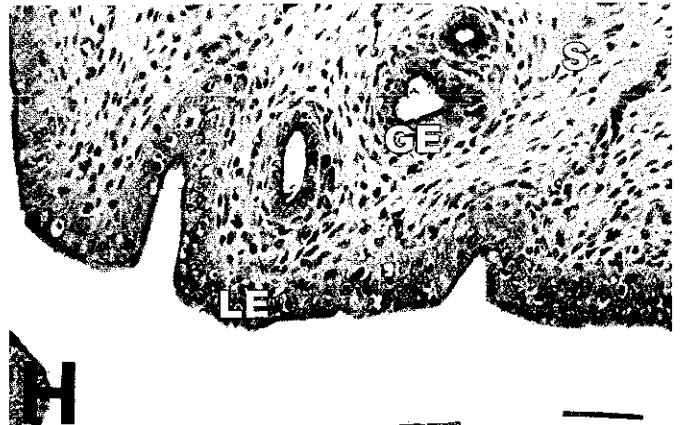
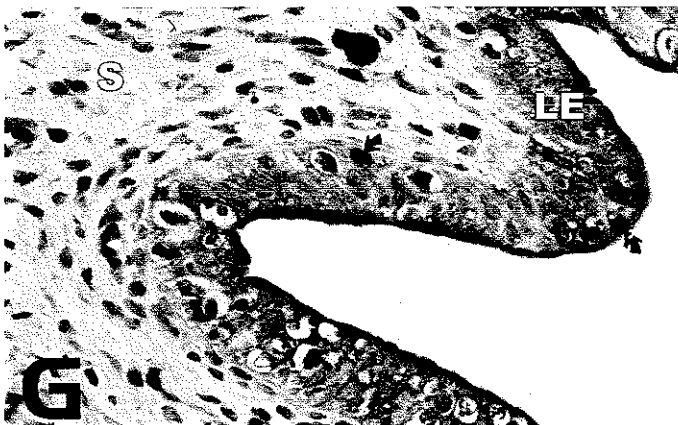
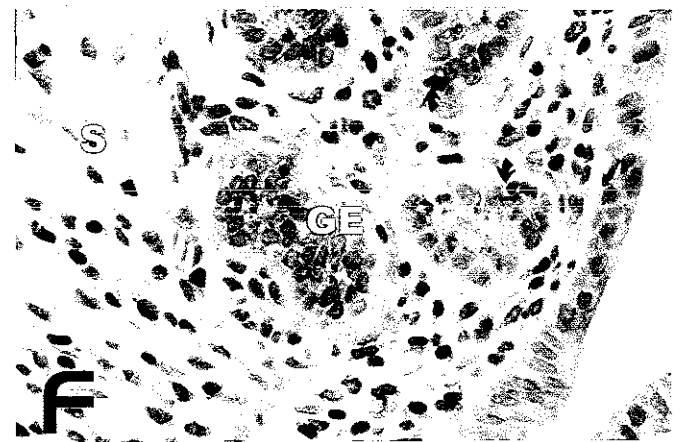
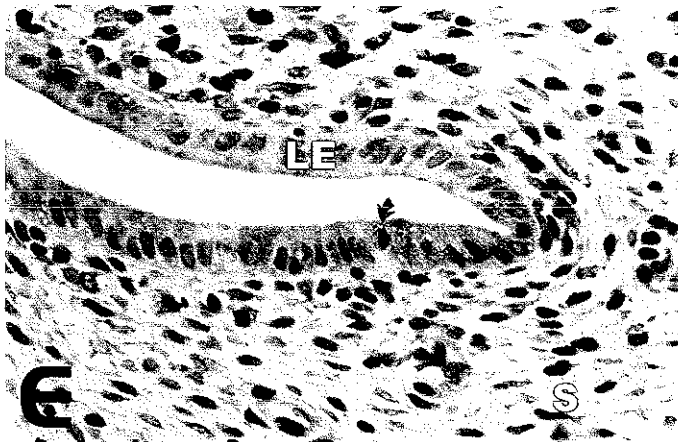
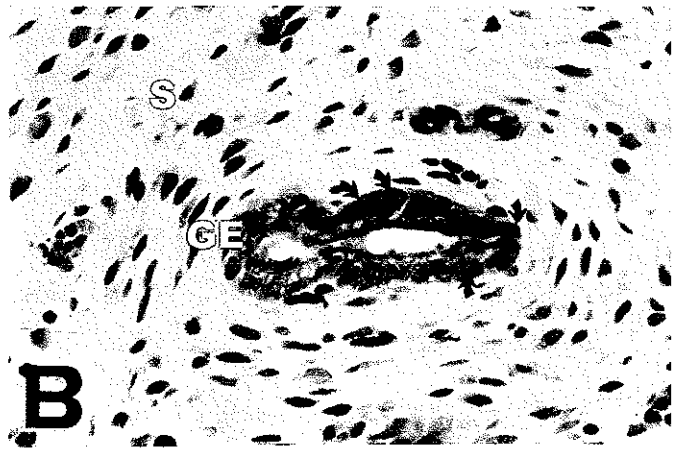
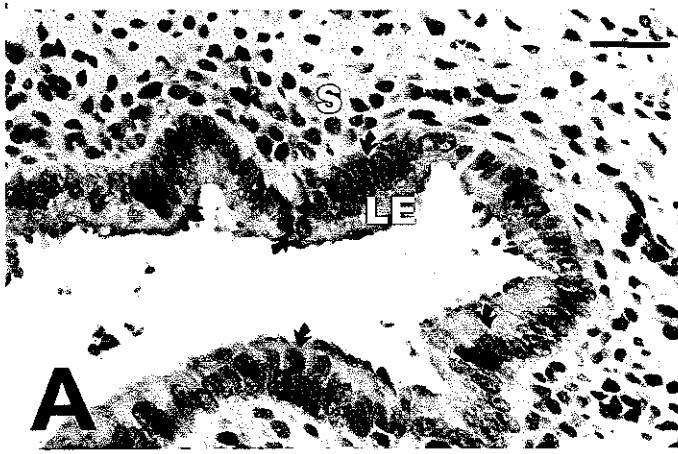


TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

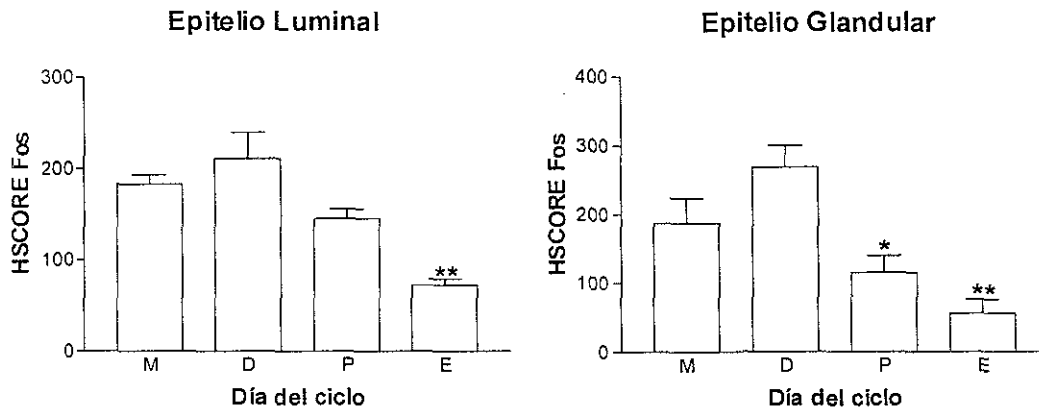
## 87 EVALUACIÓN DE LA PROTEÍNA C-FOS POR INMUNOHISTOQUÍMICA

La proteína c-Fos se detectó por inmunohistoquímica. Esta proteína se detectó en el núcleo de las células del epitelio glandular y luminal (Fig 14). En ambos epitelios, la mayor cantidad de núcleos inmunopositivos para Fos se detectaron en la etapa del diestro (Figs 14 y 15), disminuyeron en el proestro y alcanzaron sus valores más bajos en el día del estro. En el epitelio luminal, el incremento observado en la proteína de Fos mostró una correlación significativa ( $r = 0.9877$ ,  $p = 0.012$ ) con el patrón de proliferación de este tipo celular. Una tendencia similar se observó en el epitelio glandular, sin embargo, la correlación no fue significativa.

**Figura 14. (Siguiendo hoja) Localización de la proteína Fos por inmunohistoquímica en el útero de la rata durante el ciclo estral.** Se presenta una inmunohistoquímica representativa de cada uno de los días del ciclo: A) y B) metaestro; C) y D) diestro; E) y F) proestro; G) y H) estro. A), C), E) y G) muestran el epitelio luminal; B), D) y F) muestran el epitelio glandular. Las flechas indican núcleos con tinción positiva a Fos. Barra = 25  $\mu\text{m}$  en A-G. En H barra = 50  $\mu\text{m}$ . LE, epitelio luminal; GE, epitelio glandular; S, estroma.



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



**Figura 15. Nivel de expresión de la proteína Fos en el epitelio uterino durante el ciclo estral.** Se realizó la inmunohistoquímica de Fos en el útero de 5 diferentes animales por cada día del ciclo estral y se determinó el número de núcleos inmunopositivos en el epitelio luminal y en el glandular M, metaestro; D, diestro; P, proestro; E, estro. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  ESM. En el epitelio luminal: \*\* $p < 0.001$  comparado con D,  $p < 0.01$  comparado con M y  $p < 0.05$  comparado con P. En el epitelio glandular: \*\* $p < 0.001$  comparado con D,  $p < 0.05$  comparado con M, y \* $p < 0.01$  comparado con D.

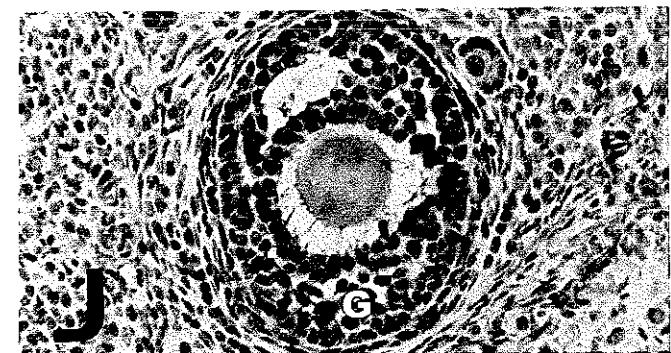
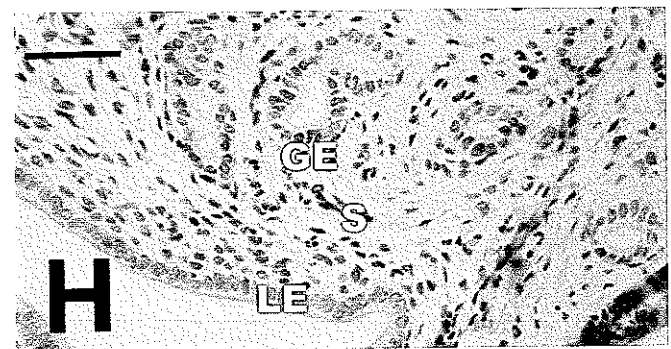
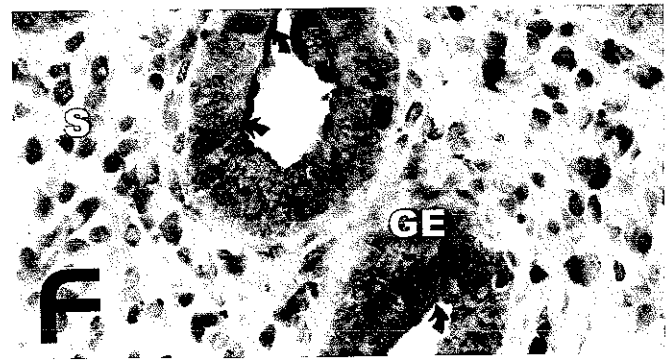
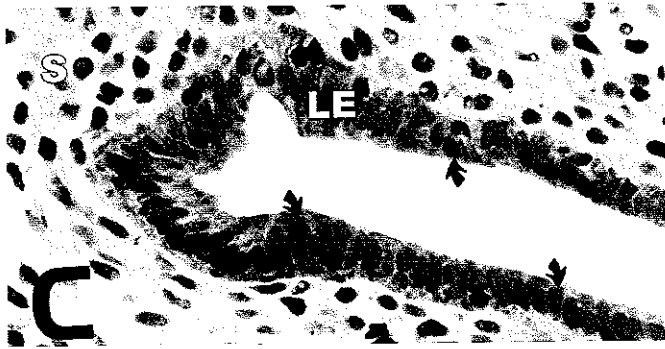
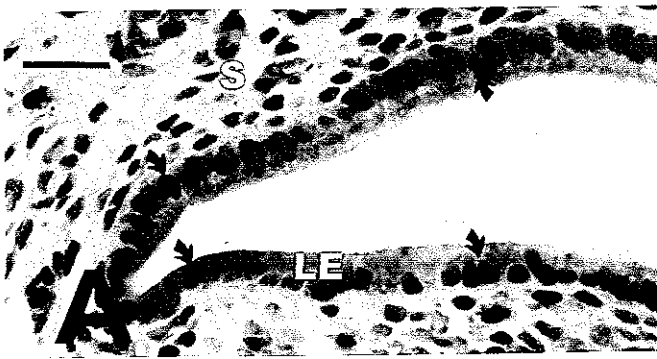
## 8.8 DETECCIÓN DEL RECEPTOR A ESTRÓGENOS $\alpha$ Y $\beta$ POR INMUNOHISTOQUÍMICA

Para determinar si la expresión de *c-fos* es regulada por el complejo RE- $E_2$ , y cual de las isoformas del RE se encuentra presente en el epitelio uterino, se llevó a cabo la inmunohistoquímica para detectar las isoformas del RE. Se observó que la isoforma predominante del RE en el útero es la isoforma  $\alpha$  (Fig 10). Tanto en el epitelio luminal como en el glandular, el mayor número de núcleos inmunopositivos para RE $\alpha$  se detectó en las etapas del metaestro y diestro, y disminuyó en las etapas de proestro y estro (Fig. 16 y 17). En las etapas de proestro y estro se observó localización citoplasmática de esta proteína. La presencia del RE $\alpha$  se

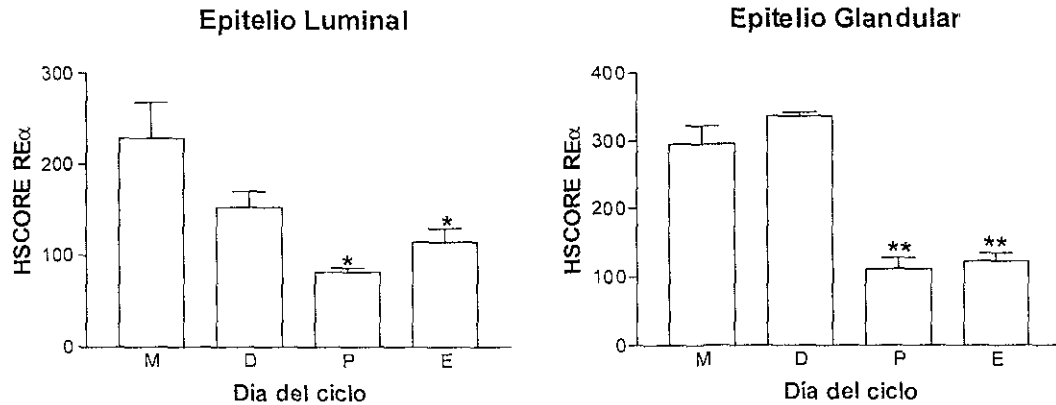
observó en el núcleo de las células del estroma en todas las etapas del ciclo. En cambio, la isoforma  $\beta$  del receptor a estrógenos no fue detectada en ninguno de los dos epitelios durante todo el ciclo estral (Fig. 16I). Sin embargo, el RE $\beta$  fue detectado tanto en el núcleo como en el citoplasma, principalmente en este último, de las células del estroma en todas las etapas del ciclo (Fig. 16I). Para verificar la eficiencia del anticuerpo se llevó a cabo la inmunohistoquímica del RE $\beta$  en el ovario de la rata, el cual es un tejido que se sabe que expresa esta proteína en altos niveles (Saunders et al., 1997; Sar y Welsch, 1999). El RE $\beta$  se detectó en este tejido en el núcleo de las células de la granulosa (Fig. 16J).

**Figura 16. (Siguiendo hoja) Localización inmunohistoquímica de la proteína del RE $\alpha$  en el útero de la rata durante el ciclo estral.** A) y B) metaestro; C) y D) diestro; E) y F) proestro; G) estro; H) control negativo (son cortes seriados del útero de rata en metaestro en el cual se omitió el anticuerpo primario) A), C), E) y G) muestran el epitelio luminal B), D) y F) muestran el epitelio glandular. Las flechas indican núcleos con tinción positiva a RE $\alpha$ . En I) se muestra la localización inmunohistoquímica del RE $\beta$  en el útero de la rata durante la etapa del metaestro, y en J) se muestra la localización de RE $\beta$  en el ovario como tejido control. Barra = 25  $\mu$ m en A-G. En H-J barra = 50  $\mu$ m. LE, epitelio luminal; GE, epitelio glandular; S, estroma; G, células de la granulosa.





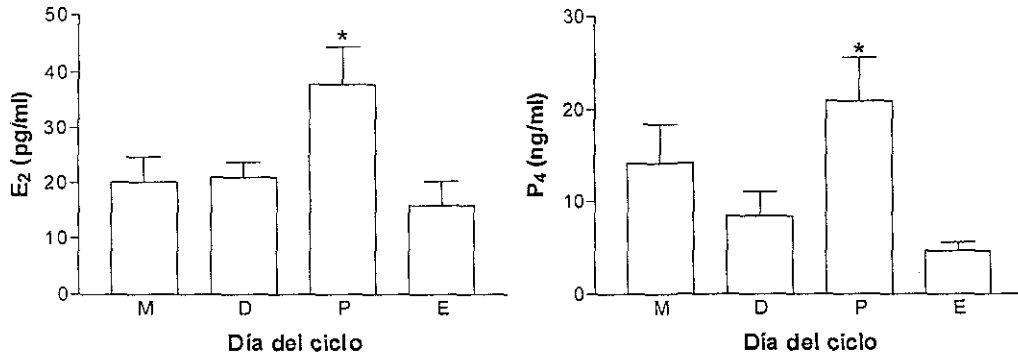
TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



**Figura 17. Nivel de expresión de la proteína RE $\alpha$  en el epitelio uterino durante el ciclo estral.** Se realizó la inmunohistoquímica del RE $\alpha$  en el útero de 5 diferentes animales por cada día del ciclo estral y se determinó el número de núcleos inmunopositivos en el epitelio luminal y en el glandular M, metaestro; D, diestro; P, proestro; E, estro. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  ESM. En el epitelio luminal: \* $p < 0.01$  comparado con M. En el epitelio glandular: \*\* $p < 0.001$  comparado con M y D.

### 8.9 NIVELES HORMONALES

Se analizó el nivel plasmático de E<sub>2</sub> y P<sub>4</sub> de todos los animales estudiados para verificar el status hormonal durante el ciclo estral. Los niveles hormonales obtenidos por RIA (Fig 18) concordaron con los datos reportados en la literatura. A las 13:00 h del día del proestro, que es la hora en que se sacrificaron a los animales, el E<sub>2</sub> se encuentra en su valor más alto de todo el ciclo ( $\cong$  40 pg/ml). La P<sub>4</sub> alcanza su nivel más alto ( $\cong$  60 ng/ml) hasta las 17:00 h del día del proestro (Fig 1), por lo cual, a las 13:00 h el nivel detectado (20 ng/ml) todavía no alcanza su máximo valor.



**Figura 18. Concentración sérica de estradiol y progesterona durante el ciclo estral.** Los niveles hormonales fueron determinados por RIA. Los resultados son expresados como la media  $\pm$  ESM de los valores obtenidos de 5 animales por cada día del ciclo M, metaestro; D, diestro; P, proestro; E, estro. \* $p < 0.05$  comparado con E

## 9.0 DISCUSIÓN

El útero de la rata es un tejido blanco considerado como clásico para la acción de las hormonas sexuales esteroides. Es bien conocido que la concentración de estas hormonas varía a lo largo del ciclo estral, lo cual induce cambios cíclicos en la estructura y función del útero. Sin embargo, aun no se conoce bien como se llevan a cabo la proliferación y muerte celular del endometrio uterino y los mecanismos moleculares por medio de los cuales las hormonas esteroides regulan dichos fenómenos. Por lo tanto, este tejido representa un modelo excelente para estudiar, en condiciones fisiológicas, la proliferación y muerte celular. Como se pudo comprobar en este trabajo, ambos procesos ocurren en el útero de la rata en diferentes etapas del ciclo estral.

En el presente estudio se determinó la proliferación y muerte celular del epitelio luminal y glandular del útero de la rata durante las diferentes etapas del ciclo estral y su correlación con la expresión del receptor a estrógenos alfa ( $RE\alpha$ ), el proto-oncogen *c-fos* y el gen supresor de tumores *p53* como parte de los genes que participan en la cascada de eventos que inducen la proliferación y la muerte celular secuencial en el epitelio uterino durante el ciclo estral.

### **9.1 PROLIFERACIÓN Y MUERTE CELULAR EN EL EPITELIO UTERINO DE LA RATA DURANTE EL CICLO ESTRAL**

Se ha establecido que durante el ciclo estral, las células del útero proliferan y después mueren por apoptosis. La proliferación, durante el ciclo estral, de cada uno de los tipos celulares del útero, ha sido determinada por medio de la medición de la actividad mitótica uterina, sin embargo los resultados de diferentes grupos no coinciden entre sí (Bertalanffy y Lau, 1963; Marcus, 1974; Bourroughs *et al.*, 2000) y pocos estudios han descrito la muerte apoptótica en el útero de la rata durante el ciclo estral (Spornitz *et al.*, 1994; Sato *et al.*, 1997; Bourroughs *et al.*, 2000). Nuestros resultados indican que los niveles máximos de proliferación celular en el epitelio glandular y luminal ocurren

durante los días del metaestro y diestro (Figs 10 y 11). Estos resultados concuerdan con el estudio previo de Burroughs y col en el cual la máxima proliferación celular en el epitelio luminal se observó, al igual que en nuestro estudio, durante el metaestro y el diestro, y la proliferación celular en el epitelio glandular fue observada solamente durante el día del metaestro (Burroughs *et al* , 2000) Siendo esta última la única diferencia, ya que en nuestro estudio también detectamos proliferación celular en el epitelio glandular durante el día del diestro. Esto seguramente se debe a la diferencia en la hora en la cual los animales fueron sacrificados en dicha investigación (entre las 12:00 y las 16:00 h), ya que sabemos que enormes cambios biológicos ocurren secuencialmente durante el ciclo estral, como lo demostró el estudio de Bertalanffy y Lau (1963) en el que se observa mayor proliferación en el epitelio glandular en la mañana del metaestro y diestro que en la tarde de dichos días. Nuestros datos de proliferación del epitelio glandular en el diestro concuerdan con los datos de Bertalanffy y Lau (1963), los cuales reportaron proliferación de este tipo celular en este día, usando otra técnica de medición.

En el útero de ratas ovariectomizadas el tratamiento con  $E_2$  induce la proliferación del epitelio luminal 24 h después de su administración y desciende a niveles basales a las 36 h (Tachi *et al* , 1972) En contraste, en el presente estudio observamos que en animales intactos el epitelio luminal presenta una proliferación sostenida durante los días del metaestro y diestro (Fig 11), a pesar de que los niveles de  $E_2$  fueron bajos durante estos días (Fig 18) Lo anterior indica que niveles bajos de  $E_2$  son suficientes para inducir la proliferación de este tipo celular, y esta proliferación sostenida no se observa en los animales ovariectomizadas. Así mismo, durante el proestro, que es cuando se detectaron los más altos niveles de  $E_2$ , el epitelio luminal continuo proliferando, pero no se detectó proliferación de este tipo celular 24 h después, esto es en el día del estro, cuando se detectó la muerte celular de los epitelios. En el epitelio glandular uterino de las ratas ovariectomizadas se observa un efecto más sostenido del  $E_2$ . En este tipo celular, la proliferación inducida por el  $E_2$  se

observa 12 h después de su administración, presenta un pico a las 48 h y regresa a niveles basales a las 72 h (Tachi et al., 1972). Durante el ciclo estral, la máxima proliferación celular en el epitelio glandular se detectó en el día del metaestro, que es 48 h después de que se observan los más altos niveles de E<sub>2</sub> en el proestro (Fig 18). Sin embargo, durante el día del diestro (72 h después del pico de E<sub>2</sub>) todavía se observó proliferación de este tipo celular. Estos resultados indican que en el útero de la rata, durante el ciclo estral, existen otros factores, además del E<sub>2</sub>, que regulan la proliferación de los epitelios del útero. Sin embargo, el estradiol sí es relevante para la proliferación del endometrio uterino, ya que en estudios con antagonistas se ha observado que los antagonistas a estrógenos, como el droloxifen y EM-652, reducen la proliferación celular del endometrio inducido por estrógenos (Eppenberger et al., 1991; Labrie et al., 1999).

Con respecto a la muerte celular programada de los epitelios del útero, se observó que el máximo índice apoptótico, tanto en el epitelio luminal como en el glandular, se presentó en el día del estro (Figs 4 y 5). Estos resultados concuerdan con los datos de microscopía electrónica presentados por Spornitz, en el cual se reporta la muerte celular del epitelio uterino de la rata durante el día del estro (Spornitz *et al.*, 1994). Más aun, nuestros resultados confirman y extienden los datos de apoptosis publicados recientemente por Bourroughs *et al.* los cuales demuestran que el máximo índice apoptótico en todos los tipos celulares del útero ocurre durante el día del estro (Bourroughs *et al.*, 2000). Sin embargo, nuestros resultados están en discrepancia con el estudio de Sato *et al.*, el cual determina que el máximo índice apoptótico del epitelio luminal ocurre durante el día del metaestro (Sato *et al.*, 1997). Esta discrepancia se puede deber a la hora a la cual se realizó el estudio. Desafortunadamente, el estudio de Sato no reporta a que hora se sacrificaron los animales, sin embargo, pensamos que estos animales se sacrificaron en las primeras horas del día, por lo cual las células del epitelio luminal aun no presentaban su máximo valor en el día del estro. El máximo índice apoptótico reportado por Sato *et al.* para este tipo celular

fue del 17.5% en el día del metaestro, y en el día del estro del 5%. A diferencia del estudio de Sato, nosotros observamos el máximo índice apoptótico (40%) en el día del estro en el epitelio luminal uterino. En otros modelos animales, tales como el útero del hámster, se ha reportado que la muerte celular programada ocurre durante el día del estro (Sandow *et al.*, 1979) y probablemente es el resultado del descenso de los niveles de E<sub>2</sub> en suero y el aumento de los niveles de P<sub>4</sub> durante esta fase del ciclo (West *et al.*, 1978).

## 9.2 EXPRESIÓN DE P53 EN EL EPITELIO UTERINO DE LA RATA DURANTE EL CICLO ESTRAL

A pesar de que existen reportes en la literatura que describen la muerte celular programada en el tejido uterino durante el ciclo estral de la rata, no se ha estudiado, en condiciones fisiológicas, ninguno de los genes involucrados en la vía apoptótica, como puede ser *p53*.

*p53* es un factor de transcripción que participa en la regulación del ciclo celular y en la apoptosis (Mendoza-Rodríguez y Cerbón, 2001b). Se piensa que *p53*, en condiciones normales, mantiene la estabilidad genómica. Esta proteína se ha descrito en células normales y tumorales del tejido reproductivo humano, incluyendo mama, ovarios, endometrio, miometrio y cerviz (Brys *et al.*, 2000; Westhof *et al.*, 2000). Sin embargo, no existe información de la presencia de esta proteína en el tejido uterino de la rata y mucho menos durante el ciclo estral.

En este estudio detectamos un incremento en el contenido de ARNm de *p53* en el día del metaestro, tanto en el epitelio luminal como en el epitelio glandular (Figs 6 y 7). En este mismo día, también observamos el mayor número de núcleos inmunopositivos en ambos epitelios. El máximo índice apoptótico de estos tipos celulares se detectó en el día del estro. En este día, la proteína *p53* se localizó predominantemente en el citoplasma de las células

epiteliales. Existen datos en la literatura que describen tanto la localización nuclear como citoplasmática de esta proteína (Molinari *et al* , 2000) En la línea celular MCF-7 de cáncer de mama se ha demostrado que el tratamiento con E<sub>2</sub> induce la localización citoplasmática de la proteína p53. La localización citoplasmática de la proteína p53 se observó 48 h después de la administración del E<sub>2</sub> (Molinari *et al* , 2000) El incremento en la localización citoplasmática de p53 observada en el día del estro podría deberse al incremento en los niveles de E<sub>2</sub> en el día del proestro, esta hipótesis merece una futura investigación La localización nuclear de esta proteína se ha correlacionado con su función normal, mientras que la localización citoplasmática se asocia principalmente a su degradación (Levine, 1997; Molinari *et al* , 2000)

Se ha reportado que la regulación de la expresión de p53 ocurre a nivel post-transcripcional debido a un incremento en la vida media de la proteína y/o un incremento en la velocidad de iniciación de la traducción del ARNm de p53 en las células (Levine, 1997) Este tipo de regulación post-transcripcional se observó en el epitelio glandular durante el diestro y el proestro, cuando los niveles de ARNm de p53, detectado por hibridación *in situ*, disminuyen manteniéndose altos los niveles de la proteína (Figs. 7 y 9)

En este estudio se observó en el día del metaestro un incremento tanto del ARNm como de la proteína de p53 en ambos epitelios (luminal y glandular) (Figs. 7 y 9) Esta evidencia sugiere que en el epitelio uterino de la rata, la expresión de p53 pudiera ser regulada también a nivel transcripcional. Estudios recientes en líneas celulares de rata, ratón y de humano indican que la expresión de p53 puede ser regulada a nivel transcripcional por diversos factores de transcripción, los cuales incluyen factor nuclear-κB (NF-κB), upstream stimulating factor (USF), Myc/Max, factor nuclear 1 (NF1), ying yang 1 (YY1), proteína activadora 1 (AP1), y Maf (Lee *et al* ., 1998; Kirch *et al* , 1999; Hale *et al* ., 2000; Lee *et al* ., 2000; Song *et al* ., 2001).



Se ha reportado que *p53* también es inducido por estrógenos en líneas celulares de cáncer (Hurd *et al.*, 1995; Moudgil *et al.*, 2001). Sin embargo, no se ha reportado un elemento de respuesta a estrógenos presente en su región promotora. Es posible, que la inducción de la expresión de *p53* inducida por estrógenos este mediada por el complejo AP-1 (Fos-Jun). También existen reportes que la proteína *p53* puede interactuar con el receptor de estrógenos. Datos recientes apoyan una intercomunicación entre las vías de señalización de *p53* y RE $\alpha$  (Liu *et al.*, 1999). Tanto estudios *in vivo* como *in vitro* indican que el RE interactúa físicamente con *p53* (Yu *et al.*, 1997), lo cual sugiere que *p53* es una proteína que al interactuar con RE modula la actividad transcripcional hormono-dependiente del RE (Yu *et al.*, 1997). Esta intercomunicación entre RE y *p53* puede tener implicaciones importantes en el entendimiento de la fisiología del útero en el cual muchas funciones están mediadas vía RE. Sin embargo, la interacción entre *p53* y RE en este tejido merece ser mejor estudiada.

Se ha reportado que *p53* participa en diversos procesos, tales como: apoptosis, ciclo celular, replicación y reparación del ADN, transducción de señales, y migración celular (Zhao *et al.*, 2000). Ha sido reportado que la proteína *p53* está implicada en la regulación del ciclo celular. Un incremento tanto en la síntesis del ARNm como en los niveles de la proteína de *p53*, ocurre antes de la síntesis del ADN, en la fase tardía de G1, lo cual indica que *p53* juega un papel importante en la progresión del ciclo celular (Reich y Levine, 1984; Shaulsky *et al.*, 1990; Steinmeyer *et al.*, 1990). Nuestros resultados apoyan esta teoría, ya que se demostró que la expresión de *p53* se incrementa en el epitelio uterino durante las fases proliferativas del ciclo estral (metaestroproestro) (Figs 7 y 9). Recientemente, se ha reportado que *p53* posee una actividad 3'-5' exonucleasa y que es capaz de unirse a la ADN polimerasa  $\alpha$  (la cual carece de actividad exonucleasa 3'-5' que elimina nucleótidos mal apareados inmediatamente después del paso de incorporación) con lo cual podría estar involucrada en la prevención y reparación de daños en el ADN (Janus *et al.*, 1999; Kuhn *et al.*, 1999).

Sin embargo, no podemos descartar que p53 juegue un papel en la muerte celular programada en este tejido. En el presente trabajo, cuando se midió la expresión de este gen durante el estro, el epitelio ya presentaba muerte celular. Es posible que si p53 regula la apoptosis de este tejido se observe un incremento en su expresión mucho tiempo antes de que se detecte la muerte celular.

Las ratas se aparean en la tarde y noche del proestro. Si el animal no se aparea, entonces se debe de encender toda la maquinaria para que se lleve a cabo la muerte celular del epitelio. Esto debe de ocurrir en las primeras horas del día del estro. Es por ello que estamos llevando a cabo experimentos para verificar si efectivamente la expresión de este gen se altera en las primeras horas del día del estro, lo que nos podría sugerir una participación de este gen en la regulación de la muerte celular.

### 9.3 EXPRESIÓN DE C-FOS Y RECEPTOR A ESTRÓGENOS $\alpha$ EN EL EPITELIO UTERINO DE LA RATA DURANTE EL CICLO ESTRAL

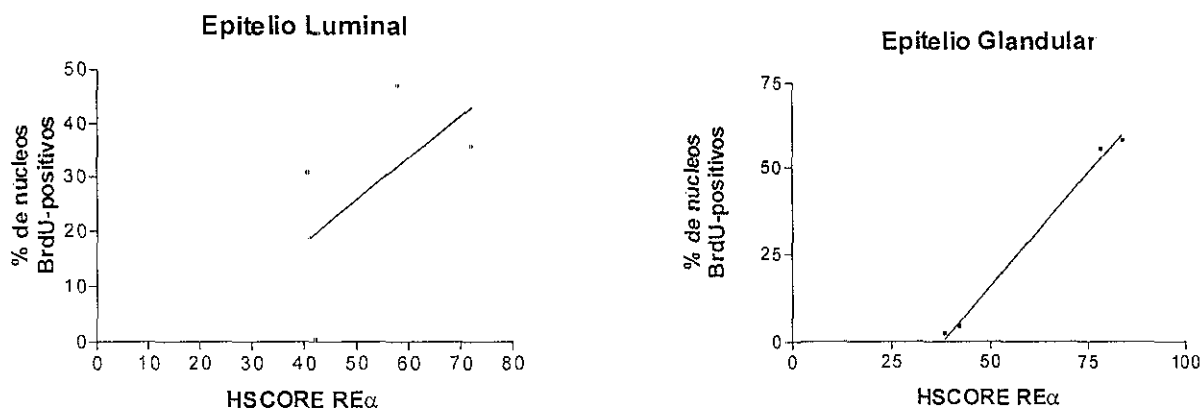
Se ha demostrado en el útero de ratas adultas ovariectomizadas que el estradiol induce la proliferación del epitelio luminal y glandular por medio de la inducción temprana de factores de transcripción los cuales incluyen diversos proto-oncogenes (Weisz *et al*, 1988; Loose-Mitchell *et al*, 1988; Nephew *et al*, 1995; Bigsby and Li, 1994; Weisz *et al*, 1990; Nephew *et al*, 1993; Webb *et al*, 1993; Travers and Knowler 1987; Murphy *et al*, 1987; Papa *et al*, 1991). La inducción del gen de *c-fos* por el estradiol en el útero de ratas ovariectomizadas ha sido ampliamente demostrada por diferentes metodologías, las cuales incluyen "Northern blot" (Weisz and Bresciani, 1988, Loose-Mitchell *et al*, 1988; Bigsby y Li, 1994), inmunohistoquímica (Papa *et al*, 1991), e hibridación in situ (Nephew *et al*, 1995).

Sin embargo, todos estos experimentos se han realizado en condiciones farmacológicas y tienen la desventaja de no presentar las mismas condiciones fisiológicas que se observan durante el ciclo estral. Se ha establecido en diversos modelos de roedores, que los animales ovariectomizados y los intactos responden de manera diferente a las hormonas esteroideas (Molnar y Murphy, 1994; Nandha et al , 1999; Cameron et al , 2002). Ciertamente, durante el ciclo estral de la rata todos los factores hormonales y ováricos podrían tener un papel en el control de la proliferación y regresión del epitelio uterino. Tomando ventaja de esta información decidimos evaluar la expresión del gen de *c-fos* en condiciones fisiológicas, tales como el ciclo estral de la rata, en el que se presentan cambios en las concentraciones de estradiol y progesterona (Freeman, 1988), los cuales inducen variaciones cíclicas en la proliferación y muerte de este tejido, como se describió anteriormente.

Se sabe, por otro lado, que en la mayoría de los mamíferos la actividad del RE $\alpha$  es regulado en el útero y en el oviducto por cambios cíclicos en los niveles hormonales. El estradiol y la progesterona administrados a ratas ovariectomizadas tienen efectos tanto inductores como represores en la expresión del RE $\alpha$  en el epitelio y el estroma del útero de la rata. Se ha demostrado que el estradiol en estos animales regula (primero inhibiendo y después induciendo) los niveles del ARNm y de la proteína del RE $\alpha$  (Nephew *et al.*, 2000). Tanto el ARNm como la proteína del RE $\alpha$  disminuyen 6 h después de la administración de estradiol en las células del epitelio uterino. Veinticuatro horas después de su administración, los niveles tanto del mensajero como de la proteína se incrementan respecto a los niveles observados antes del tratamiento, regresando a sus niveles basales a las 72 h (Nephew *et al.*, 2000). Se ha observado que la progesterona también reduce la expresión del RE $\alpha$  en el epitelio luminal de las ratas ovariectomizadas pretratadas con estradiol (Wang *et al.*, 1999). De acuerdo con estas observaciones nosotros detectamos que los niveles más bajos de expresión del RE $\alpha$  fueron durante los días del proestro y estro (Figs 16 y 17), cuando los niveles de estradiol y progesterona son los más

altos del ciclo. En nuestro estudio en animales intactos la presencia del RE $\alpha$  se observó en las células del estroma en todas las etapas del ciclo, lo cual concuerda con lo reportado en animales maduros ovariectomizados tratados con estradiol en los cuales el contenido del RE $\alpha$  no presenta cambios en este tipo celular durante el tratamiento (Katzuda *et al* , 1999)

Se ha sugerido que el RE $\alpha$  es el subtipo dominante en el epitelio luminal y glandular en el útero de la rata (Wang *et al* , 1999) Apoyando esta idea nosotros observamos que el RE $\beta$  no fue detectado en ambos epitelios durante todas las etapas del ciclo (Fig 16) Sin embargo, dicho receptor fue detectado tanto en el citoplasma como en el núcleo de las células del estroma, observándose la máxima inmunotinción en los días del metaestro y del diestro. Estos resultados apoyan la idea de que los estrógenos producen efectos diferentes dependiendo de su interacción con el RE $\alpha$  o el RE $\beta$  en el epitelio y el estroma del útero de la rata durante el ciclo estral. En el epitelio glandular la alta expresión del RE $\alpha$  durante los primeros días del ciclo presentó una correlación positiva con la proliferación de este tipo celular ( $r = 0.9974$ ,  $p = 0.0026$ ) Esta misma tendencia se observó en el epitelio luminal, sin embargo, no se observó una correlación significativa (Fig. 19).



**Figura 19. Correlación entre la proteína del RE $\alpha$  y la proliferación de los epitelios uterinos durante el ciclo estral. Se muestra la regresión lineal**

Es bien sabido que el complejo hormona-receptor inicia respuestas en el útero al interactuar con elementos de respuesta hormonal presentes en diversos genes, de entre ellos los de expresión temprana, cuyas proteínas se piensa que amplifican las señales que provienen del complejo hormona-receptor (Mendoza-Rodríguez *et al.*, 2001a). Algunos de estos genes que han sido ampliamente estudiados son los factores de transcripción miembros de la familia AP-1. En efecto, en ratas ovariectomizadas la expresión de *c-fos* es inducida en forma rápida por estradiol, tanto en el epitelio luminal como glandular del útero (Weisz y Bresciani, 1988), y esta regulación se lleva a cabo a nivel transcripcional (Weisz y Rosales, 1990; Hyder *et al.*, 1991a y b) y el ARNm presenta una vida media corta. En este estudio la máxima expresión del ARNm de *c-fos* se detectó en el día del metaestro (Figs. 12 y 13), cuando hay bajos niveles de E<sub>2</sub> (Fig. 18), seguida de una reducción significativa en los siguientes días del ciclo. Así mismo, no se encontró una correlación estricta entre el ARNm de *c-fos* y la proteína del RE $\alpha$ . En las ratas ovariectomizadas tampoco se observa una correlación estricta entre estos 2 parámetros. En los animales ovariectomizados, el ARNm de *c-fos* es inducido 2-3 h después de la administración del E<sub>2</sub> (Papa *et al.*, 1991; Nephew *et al.*, 1995), mientras que la proteína del RE $\alpha$  es inhibida 3-6 h después de la administración de la hormona seguido por un incremento de la misma 24 h después del tratamiento (Nephew *et al.*, 2000). Se sabe que el promotor de *c-fos* contiene ERE. En el día del metaestro, el incremento observado en la proteína del RE $\alpha$  podría directamente estimular la expresión de *c-fos*. Sin embargo, en el día del diestro, todavía se observan niveles elevados del RE $\alpha$ , pero bajos niveles del ARNm de *c-fos*. Esto podría deberse a la regulación del promotor de *c-fos* por otros estímulos (Karin *et al.*, 1997). Por lo tanto, la regulación de la expresión de *c-fos* en animales intactos parece no estar regulada solamente por el estradiol, sino también por otros factores de transcripción.

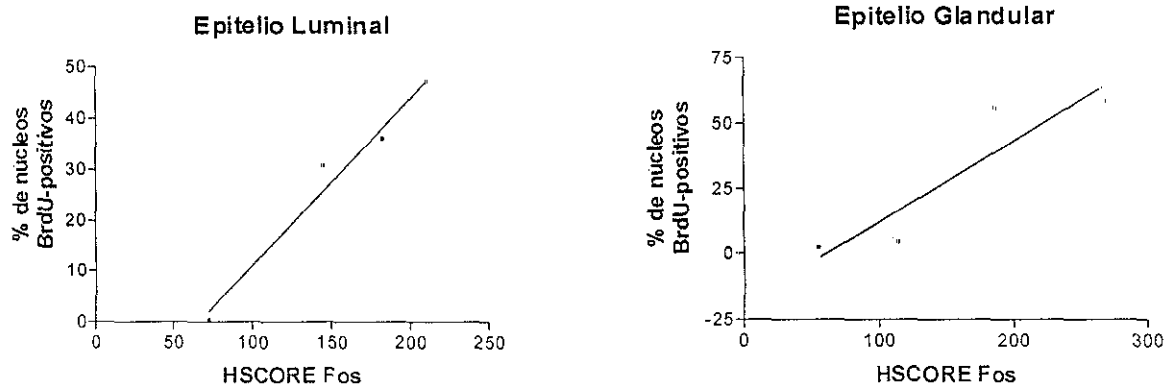
La máxima expresión del ARNm de *c-fos* se detectó en el día del metaestro (Figs. 12 y 13), mientras que los niveles de la proteína de Fos se

mantuvieron elevados durante los días del metaestro y del diestro (Fig 15) Lo anterior indica que *c-fos* también se regula al nivel post-transcripcional. En el epitelio uterino de las ovejas también se ha observado esta regulación post-transcripcional de *c-fos* durante el ciclo estral (Johnson et al , 1997). En otros modelos biológicos, tales como la regeneración del hígado del ratón, los niveles estables de los transcritos de *c-fos* se mantienen durante varias horas debido a mecanismos de control post-transcripcional (Sobczak et al., 1989). Así mismo, en fibroblastos humanos, la inducción tanto del ARNm como de la proteína de *c-fos* sugiere que la regulación no solamente ocurre por la activación de la transcripción, sino también al nivel de la degradación de la proteína (Rahmsdorf et al , 1987)

Nuestros resultados muestran que en animales intactos la máxima expresión de la proteína Fos en los epitelios uterinos se detectó cuando estos tipos celulares presentaron la máxima proliferación (metaestro y diestro) (Figs 11 y 15). Sin embargo, en el día del proestro, se observó una mínima proliferación del epitelio glandular a pesar de que se detectó la presencia de la proteína c-Fos, aunque presentó un menor contenido que en metaestro y diestro. Estos resultados indican que existe una clara correlación entre la proteína c-Fos y la proliferación del epitelio luminal ( $r= 0.9877$ ,  $p= 0.012$ ). Esta misma tendencia se observó en el epitelio glandular, a pesar de que no se observó una correlación significativa (Fig. 20)

Se ha reportado que las ciclinas D1 y D3 son inducidas por estrógenos en las células epiteliales del endometrio (Zhuang et al , 2001). Fos regula la transcripción de la ciclina D1, directa o indirectamente (Brown et al., 1998), y podría funcionar como una conexión importante entre la estimulación por estradiol y la proliferación celular. En las ratas ovariectomizadas, el tratamiento con estradiol induce la expresión diferencial de las ciclinas D1 Y D3 en el epitelio luminal y glandular, respectivamente, lo cual indica que en estos tipos celulares existe una regulación específica para cada tipo celular. Estos resultados están

en línea con la expresión diferencial de la proteína Fos en ambos epitelios observada en este estudio



**Figura 20. Correlación entre la proteína Fos y la proliferación de los epitelios uterinos durante el ciclo estral. Se muestra la regresión lineal.**

En conclusión los resultados de este estudio indican que la proteína c-Fos podría estar involucrado en la regulación de la proliferación del epitelio uterino durante el ciclo estral de la rata. Este estudio es el primero que muestra de manera clara dicha correlación y permitirá estudiar los cambios en los patrones de expresión del ARNm y de la proteína de este gen en la transformación celular del endometrio. Así mismo, representa un excelente modelo para evaluar in vivo el efecto de nuevas variantes de esteroides con actividad estrogénica agonista u antagonista, importantes para la terapia de reemplazo hormonal en la menopausia, así como en el tratamiento y prevención de tumores del aparato reproductivo.

## 10. CONCLUSIONES

De acuerdo a los objetivos de este trabajo, nuestros resultados indican que:

1 El mayor contenido de ARNm de *p53* se observó en el citoplasma de las células del epitelio luminal y glandular en el día del metaestro y este disminuyó a lo largo del ciclo hasta llegar a su nivel más bajo en el día del estro. Respecto a la proteína de *p53*, la mayor cantidad de núcleos inmunopositivos fueron detectados, en ambos epitelios, en el día del metaestro. En el epitelio luminal, el número de núcleos inmunopositivos disminuyó en los siguientes días del ciclo estral, y se observó el valor más bajo en el día del estro. En el epitelio glandular el número de núcleos inmunopositivos fue similar durante los días del metaestro, diestro y proestro y disminuyó significativamente durante el día del estro.

El mayor contenido del ARNm de *c-fos* se observó, tanto en epitelio luminal como en el glandular, en el día del metaestro y este disminuyó a lo largo del ciclo hasta llegar a sus niveles más bajos en el día del estro. En ambos epitelios, la mayor cantidad de núcleos inmunopositivos para la proteína Fos se detectaron en la etapa del diestro, disminuyeron en el proestro y alcanzaron sus valores más bajos en el día del estro.

2 El máximo índice apoptótico de ambos epitelios se detectó en la etapa del estro y las características morfológicas que presentaban las células muertas son distintivas de apoptosis. Durante la etapa del estro se detectaron los niveles más bajos tanto del ARNm como de la proteína de *p53*. Sin embargo, no podemos descartar que *p53* juegue un papel en la apoptosis de este tejido. Es posible que si *p53* regula la apoptosis de este tejido se observe un incremento en su expresión mucho tiempo antes de que se detecte la muerte celular. La presencia de *p53*



durante las fases proliferativas del ciclo estral sugiere que p53 debe de tener un papel fisiológico importante durante estas etapas en el útero de la rata

3. El epitelio luminal uterino presenta proliferación durante las etapas del metaestro, diestro y proestro, mientras que el epitelio glandular solamente prolifera durante el metaestro y el diestro. Los resultados de este estudio indican que existe una buena correlación entre la proteína c-Fos y la proliferación celular del epitelio uterino de la rata durante el ciclo estral, lo que sugiere que esta proteína podría estar involucrada en la regulación de la proliferación de estos tipos celulares

4. Se observó que la isoforma predominante del receptor a estrógenos (RE) en el útero es la isoforma  $\alpha$ , ya que la isoforma  $\beta$  no fue detectada en ninguno de los dos epitelios durante todo el ciclo estral. Tanto en el epitelio luminal como en el glandular, el mayor número de núcleos inmunopositivos para RE $\alpha$  se detectó en las etapas del metaestro y diestro, y disminuyó en las etapas de proestro y estro. No se encontró una correlación estricta entre el ARNm de *c-fos* y la proteína del RE $\alpha$ , lo cual sugiere que la expresión de *c-fos* es regulada por otros factores de transcripción, además del RE $\alpha$ , en el útero de la rata durante el ciclo estral.

## 11. PERSPECTIVAS

Finalmente, los resultados obtenidos han demostrado que los cambios que presenta el útero durante el ciclo estral representan un excelente modelo para estudiar factores de transcripción involucrados con la muerte celular programada o con en el proceso de proliferación celular del útero.

Es por ello que actualmente estamos buscando cambios en la expresión de genes involucrados en el proceso de muerte celular, como son *bcl-2*, *bax*, *bcl-x<sub>L</sub>* y *bcl-x<sub>S</sub>* en la noche del proestro-madrugada del estro, que es la etapa en la que se define la muerte del epitelio. Así mismo, es interesante estudiar cual es el estímulo que detiene la muerte celular cuando los animales se aparean: es la fecundación del óvulo o tan solo el estímulo de la cópula logra evitar la muerte celular.

Con respecto a la proliferación celular, es importante estudiar que genes son regulados por el complejo AP-1 que pudieran estar involucrados en el proceso de proliferación. Entre estos, un buen candidato es la ciclina D, ya que se ha reportado que su expresión es inducida por AP-1 en otros modelos.

Sin embargo, es importante recordar que los estudios realizados en la presente tesis solamente correlacionan los parametros evaluados. Es por ello que para saber si efectivamente Fos está involucrado en la proliferación del endometrio sería necesario usar un modelo en el que se delete este gen y se observe como se afecta la proliferación del epitelio uterino.

Así mismo, este es un excelente modelo para evaluar in vivo el efecto de esteroides con actividad estrogénica agonista u antagonista, importantes para la terapia de reemplazo hormonal en la menopausia, así como en el tratamiento y prevención de tumores del aparato reproductivo.

## 12. REFERENCIAS

- Abraham GE (1975) Radioimmunoassays of steroids in biological fluids. *J Steroid Biochem* 6, 261
- Albanese C, Johnson J, Watanabe G, Eklund N, Vu D, Arnold A, Pestell RG (1995) Transforming p21ras mutants and c-Ets-2 activate the cyclin D1 promoter through distinguishable regions. *J Biol Chem* 270, 23589
- Angel P, Hattori K, Smeal T, Karin M (1988) The jun proto-oncogene is positively autoregulated by its product, Jun/AP-1. *Cell* 55, 875.
- Angel P, Karin M (1991) The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochim Biophys Acta* 1072, 129
- Baichwal VR, 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.
- Bakiri L, Lallemand D, Bossy-Wetzel E, Yaniv M (2000) Cell cycle-dependent variations in c-Jun and JunB phosphorylation: a role in the control of cyclin D1 expression. *EMBO J* 19, 2059
- Bates S, Vousden KH (1999) Mechanisms of p53-mediated apoptosis. *Cell Mol Life Sci* 55, 28.
- Beier F, Lee RJ, Taylor AC, Pestell RG, LuValle P (1999) Identification of the cyclin D1 gene as a target of activating transcription factor 2 in chondrocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 1433
- Bertalanffy FD, Lau C (1963) Mitotic rates, renewal times, and cytodynamics of the female genital tract epithelia in the rat. *Acta Anat* 54, 39.
- Bigsby RM, Li A (1994) Differentially regulated immediate early genes in the rat uterus. *Endocrinol* 134, 1820.
- Bourroughs KD, Fuchs-Young R, Davis B, Walker CL (2000) Altered hormonal responsiveness of proliferation and apoptosis during myometrial maturation and the development of uterine leiomyomas in the rat. *Biol Rep* 63, 1322
- Brenner DA, O'Hara M, Angel P, Chojker M, Karin M (1989) Prolonged activation of jun and collagenase genes by tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Nature* 337, 661
- Brown JR, Nigh E, Lee RJ, Ye H, Thompson MA, Saudou F, Pestell RG, Greenberg ME (1998) Fos family members induce cell cycle entry by activating cyclin D1. *Mol Cell Biol* 18, 5609
- Brown-Grant K, Exley D, Naftolin F (1970) Peripheral plasma oestradiol and luteinizing hormone concentrations during the oestrus cycle of the rat. *J Endocr* 48, 295
- Brys M, Semczuk A, Wojcik M, Krajewska VM, Jakowicki JA (2000) p53 protein detection by western blotting technique in normal and neoplastic specimens of human endometrium. *Cancer Lett* 148, 197

- Buckbinder L, Talbott R, Valesco-Miguel S, Takenaka I, Faha B, Seizinberg BR, Kley N (1995) Induction of the growth inhibitor IGF-binding protein 3 by p53. *Nature* 377, 646.
- Butcher RL, Collins WE, Fugo NW (1974) Plasma concentration of LH, FSH, prolactin, progesterone and estradiol-17 $\beta$  throughout the 4-day estrous cycle of the rat. *Endocrinol* 94, 1704
- Caelles C, Heimberg A, Karin M (1994) p53-dependent apoptosis in the absence of p53-target genes. *Nature* 370, 220
- Cameron VA, Autelitano DJ, Evans JJ, Ellmers LJ, Espiner EA, Nicholls MG, Richards AM (2002) Adrenomedullin expression in rat uterus is correlated with plasma estradiol. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282, E139
- Canman CE, Gilmer TM, Coutts SB, Kastan MB (1995) Growth factor modulation of p53-mediated growth arrest versus apoptosis. *Genes & Dev* 9, 600.
- Caspari T (2000) Checkpoints: How to activate p53. *Current Biol* 10, R315
- Cattaneo E, Maggi A (1990) c-fos induction by estrogen in specific rat brain areas. *Eur J Pharmacol* 188, 153
- Cho Y, Gorina S, Jeffrey PD, Pavletich NP (1994) Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations. *Science* 265, 346.
- Cicatiello L, Ambrosino C, Coletta B, Scalona M, Sica V, Bresciani F, 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, 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.
- Curran T, Gordon MB, Rubino KL, Sambucetti LC (1987) Isolation and characterization of the *c-fos* (rat) cDNA and analysis of post-translational modification *in vitro*. *Oncogene* 2, 79.
- Curtis SW, Washburn T, Sewall C, DiAugustine R, Lindzey J, Couse JF (1996) Physiological coupling of growth factor and steroid receptor signaling pathways: estrogen receptor knockout mice lack estrogen-like response to epidermal growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 12626
- Dang CV, McGuire M, Buckmire M, 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, Lippman ME (1989) The role of estrogens in growth regulation of breast cancer. *Rev. Oncogenesis* 1, 89
- DiAugustine RP, Petrusz P, Bell GI, Brown CF, Korach KS, McLachlan JA, Teng CT (1988) Influence of estrogens on mouse uterine epidermal growth factor precursor protein and messenger ribonucleic acid. *Endocrinol* 122, 2355

- Delavaine L, La Thangue NB (1999) Control of E2F activity by p21<sup>Waf1/Cip1</sup>. *Oncogene* 18, 5381
- El-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parson R, Trent JM, Lin D, Mercer WE, Kinzler KW, Vogelstein B (1993) *WAF1*, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 75, 817
- Eppenberger U, Wosikowski K, Kung W (1991) Pharmacologic and biologic properties of droloxifene, a new antiestrogen. *Am J Clin Oncol* 14, S5.
- 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.
- 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
- Gottlieb E, Haffner R, von Ruden T, Wagner EF, Oren M (1994) Down-regulation of wild-type p53 interferes with apoptosis of IL-3-dependent hematopoietic cells following IL-3 withdrawal. *EMBO J* 13, 1368.
- Hafez ESE (1970) Female reproductive organs. En: *Reproduction and breeding techniques for laboratory animals* (Hafez ESE, ed) pp 74, Lea y Febiger, USA.
- Halazonetis TD, Georgopoulos K, Greenberg ME, Leder P (1988) c-Jun dimerizes with itself and with c-Fos, forming complexes of different DNA Binding Affinities. *Cell* 55, 917
- Hale TK, Myers C, Maitra R, Kolzau T, Nishizawa M, Braithwaite AW (2000) Maf transcriptionally activates the mouse p53 promoter and causes a p53-dependent cell death. *J Biol Chem* 275, 17991
- Haupt Y, Rown S, Shaulian E, Vousden K, Oren M (1995) Induction of apoptosis in HeLa cells by transactivation-deficient p53. *Genes & Dev* 9, 2170
- Herber B, Truss M, Beato M, Muller R (1994) Inducible regulatory elements in the human cyclin D1 promoter. *Oncogene* 9, 1295
- Hietanen S, Lain S, Krausz E, Blattner C, Lane DP (2000) Activation of p53 in cervical carcinoma cells by small molecules. *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 8501.
- Hollstein M, Rice K, Greenblatt MS, Soussi T, Fuchs R, Sorlie T, Hovig E, Smith-Sorensen B, Montesano R, Harris CC (1994) Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines. *Nucleic Acids Res* 22, 3551
- Holt JT, Venkat GT, Moulton AD, Nienhuis AW (1986) Inducible production of c-fos antisense RNA inhibits 3T3 cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci USA* 83, 4794
- Hope IA, Struhl K (1987) GCN4, a eukaryotic transcriptional activator protein, binds as a dimer to target DNA. *EMBO J* 6, 2781
- Howes KA, Ransom N, Pepermaster DS, Lasudry JGH, Albert DM, Windle JJ (1994) Apoptosis of retinoblastoma: alternative fates of photoreceptors expressing the HPV-16 E7 gene in the presence or absence of p53. *Genes & Dev* 8, 1300.
- Huet-Hudson YM, Chakraborty C, De SK, Suzuki Y, Andrews GK, Dey SK (1990) Estrogen regulates the synthesis of epidermal growth factor in mouse uterine epithelial cells. *Mol Endocrinol* 4, 510

- Hurd C, Khattree N, Alban P, Nag K, Jhanwar SC, Dinda S, Moudgil VK (1995) Hormonal regulation of the p53 tumor suppressor protein in T47D human breast carcinoma cell line. *J Biol Chem* 270, 28507
- Hyder SM, Cram LF, 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, Stancel GM, Loose-Mitchell DS (1991b) Presence of an estradiol response region in the mouse *c-fos* oncogene. *Steroids* 56, 498
- Janus F, Albrechtsen N, Dornreiter I, Wiesmüller L, Grosse F, Deppert W (1999) The dual role model for p53 in maintaining genomic integrity. *Cell Mol Life Sci* 55, 12
- Jayaraman L, Prives C (1995) Activation of p53 sequence-specific DNA binding by short single strands of DNA requires the p53 C-terminus. *Cell* 81, 1021
- Johnson ML, Redmer DA, Reynolds LP (1997) Uterine growth, cell proliferation, and *c-fos* proto-oncogene expression throughout the estrous cycle in ewe. *Biol Reprod* 56, 393
- Johnson RS, Spiegelman BM, Papaioannou V (1992) Pleiotropic effects of a null mutation in the *c-fos* proto-oncogene. *Cell* 71, 577.
- Jooss KU, Funk M, Müller R (1994) An autonomous N-terminal transactivation domain in Fos protein plays a crucial role in transformation. *EMBO J* 13, 1467.
- Karin M, Liu Z, Zandi E (1997) AP-1 function and regulation. *Curr Opin Cell Biol* 9, 240.
- Karnovsky MJ (1965) A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in Electron Microscopy. *J Cell Biol* 27, 137
- Kastan MB, Zhan Q, El-Deiry WS, Carrier F, Jacks T, Walsh WV, Plunkett BS, Vogelstein B, Fornace AJ Jr (1992) A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia. *Cell* 71, 587.
- Katsuda S-I, Yoshida M, Watanabe T, Kuroda H, Ando-Lu J, Takahashi M, Hayashi H, Maekawa A (1999) Estrogen receptor mRNA in uteri of normal estrous cycling and ovariectomized rats by in situ hybridization. *Proc Soc Exp Biol Med* 221, 207.
- Kaye AM, Sheratzky D, 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, Roberts AB (1990) Autoinduction of transforming growth factor beta 1 is mediated by the AP-1 complex. *Mol Cell Biol* 10, 1492.
- Kirch HC, Flawinkel S, Rumpf H, Brockmann D, Esche H (1999) Expression of human p53 requires synergistic activation of transcription from the p53 promoter by AP-1, NF- $\kappa$ B and Myc/Max. *Oncogene* 18, 2728
- Kirkland JL, LaPointe L, Justin E, 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, Stancel GM (1992) Progesterone inhibits the estrogen-induced expression of *c-fos* messenger ribonucleic acid in the uterus. *Endocrinol* 130, 3223

- Ko LJ, Prives C (1996) p53: puzzle and paradigm. *Genes & Dev* 10, 1054
- Kouzarides T, Ziff E (1988) The role of leucine zipper in the fos-jun interaction. *Nature* 336, 646
- Kraus WL, Katzenellenbogen BS (1993) Regulation of progesterone receptor gene expression and growth in the rat uterus: modulation of estrogen actions by progesterone and sex steroid hormone antagonists. *Endocrinol* 132, 2371
- Kruijer W, Cooper JA, Hunter T, Verma IM (1984) Platelet-derived growth factor induces rapid but transient expression of the c-fos gene and protein. *Nature* 334, 538.
- Kubbutat MH, Jones SN, Vousden KH (1997) Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature* 387, 299.
- Kuhn C, Muller F, Melle C, Nasheuer HP, Janus F, Deppert W, Grosse F (1999) Surface plasmon resonance measurements reveal stable complex formation between p53 and DNA polymerase alpha. *Oncogene* 18, 769
- Labrie F, Labrie C, Bélanger A, Simard J, Gauthier S, et al (1999) EM-652 (SCH 57068), a third generation SERM acting as pure antiestrogen in the mammary gland and endometrium. *J Steroid Biochem Mol Biol* 69, 51
- Lai MD, Lee LR, Cheng KS, Wing LYC (2000) Expression of proliferating cell nuclear antigen in luminal epithelium during the growth and regression of rat uterus. *J Endocrinol* 166, 87
- Landschultz WH, Johnson PF, McKnight SL (1988) The leucine zipper protein: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding protein. *Science* 240, 1759
- Lee M, Park S, Song H, Park J-S (1998) Transcription of the rat p53 gene is induced by a 39 kDa protein binding to the p53 promoter region during liver regeneration. *Biochem Mol Biol Int* 46, 765
- Lee M, Yu S, Park J-S (2000) Biochemical characterization of a nuclear factor that binds to NF1-like elements in the rat p53 promoter. *J Cell Biochem* 78, 1.
- Lessey BA, Killam AP, Metzger DA, Haney AF, Greene GL, McCarty KS Jr (1988) Immunohistochemical analysis of the human uterine estrogen and progesterone receptors throughout the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 67, 334
- Levine AJ (1997) p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88, 323
- Liu G, Schwartz JA, Brooks SC (1999) p53 down regulates ER-responsive genes by interfering with the binding of ER to ERE. *Biochem Biophys Res Comm* 264, 359.
- Loose-Mitchell DS, Chiappetta C, Stancel GM (1988) Estrogen regulation of *c-fos* messenger ribonucleic acid. *Mol Endocrinol* 2, 946
- Lowe SW, Ruley HE, Jacks T, Houseman DE (1993a) p53-Dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. *Cell* 74, 957.
- Lowe SW, Schmitt EM, Smith SW, Osborne BA, Jacks T (1993b) p53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes. *Nature* 362, 847
- McKenna NJ, Lanz RB, O'Malley BW (1999) Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocr Rev* 20, 321

- McKenna NJ, O'Malley BW (2000) From ligand to response: generating diversity in nuclear receptor coregulator function. *J Steroid Biochem Mol Biol* 74, 351
- Marcus GJ (1974) Mitosis in the rat uterus during the estrous cycle, early pregnancy, and early pseudopregnancy. *Biol Reprod* 10, 447
- Martin L, Das RM, Finn CA (1973) The inhibition by progesterone of uterine epithelial proliferation in the mouse. *J Endocrinol* 57, 549.
- Mendoza-Rodríguez CA, Arrieta-Cruz I, Rodríguez-Dorantes M, Camacho-Arroyo I, Cerbón M (2001a) Regulación de la transcripción por hormonas esteroides. En: Mensaje Bioquímico (Juárez MA, Pardo JP, del Arenal IP, Cea A, Piña E, ed) pp 129, Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Mendoza-Rodríguez CA, Cerbón MA (2001b) El gen supresor de tumores p53: mecanismo de acción en la proliferación y muerte celular. *Rev Inv Clin* 53, 266.
- Merchant-Larios H, Moreno-Mendoza N, Buehr M (1993) The role of the mesonephros in cell differentiation and morphogenesis of the mouse fetal testis. *Int J Dev Biol* 37, 407
- Miller AD, Curran T, Verma IM (1984) c-fos protein can induce cellular transformation: a novel mechanism of activation of a cellular oncogene. *Cell* 36, 51
- Miyashita T, Krajewski S, Krajewska M, Wang HG, Lin HK, Liebermann DA, Hoffman B, Reed JC (1994) Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene* 9, 1799.
- Miyashita T, Reed JC (1995) Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* 80, 293
- Molinari AM, Bontempo P, Schiavone EM, Tortora V, Verdicchio MA, Napolitano M, Nola E, Moncharmont B, Medici N, Nigro V, Armetta I, Abbondanza C, Puca GA (2000) Estradiol induces functional inactivation of p53 by intracellular redistribution. *Cancer Res* 60, 2594.
- Molnar P, Murphy LJ (1994) Effects of oestrogen on rat uterine expression of insulin-like growth factor-binding proteins. *J Mol Endocrinol* 13, 59.
- Moudgil VK, Dinda S, Khattree N, Jhanwar S, Albanp, Hurd C (2001) Hormonal regulation of tumor suppressor proteins in breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 76, 105.
- Muegge K, Williams TM, Kant JA, Karin M, Chiu R, Schmidt A, Siebenlist U, Young HA, Durrum SK (1989) Interleukin-1 costimulatory activity on the interleukin-2 promoter via AP-1. *Science* 246, 249.
- Murphy LJ, Ghahary A (1990) Uterine insulin-like growth factor-1: regulation of expression and its role in estrogen-induced uterine proliferation. *Endocr Rev* 11, 443.
- Murphy LJ, Murphy LC, Friesen HG (1987) Estrogen induction of *N-myc* and *c-myc* proto-oncogene expression in the rat uterus. *Endocrinol* 120, 1882
- Nandha KA, Benito-Orfila MA, Jamal H, Akinsanya KO, Bloom SR, Smith DM (1999) Effect of steroids and the estrous cycle on uterine neuromedin U receptor expression. *Peptides* 20, 1203.



- Nephew KP, Long X, Osborne E, Burke KE, Ahluwalia A, Bigsby RM (2000) Effect of estradiol on estrogen receptor expression in rat uterine cell types. *Biol Reprod* 62, 168.
- Nephew KP, Peters GA, 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. *Endocrinol* 136, 3007
- Nephew KP, Tang M, Khan SA (1994) Estrogen differentially affects *c-jun* expression in uterine tissue compartments. *Endocrinol* 134, 1827
- Nephew KP, Webb DK, Akcali KC, Moulton BC, Khan SA (1993) Hormonal regulation and expression of the *jun-D* protooncogene in specific cell types of the rat uterus. *J Steroid Biochem Mol Biol* 46, 281.
- Oren M (1994) Relationship of p53 to the control of apoptotic cell death. *Semin Cancer Biol* 5, 221
- O'Shea EK, Rutkowski R, 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
- Piechaczyk M, Blanchard J-M (1994) *c-fos* protooncogene regulation and function. *Crit Rev Oncol Hematol* 17, 93
- Pollard JW, Pacey J, Cheng SVY, Jordan EG (1987) Estrogens and cell death in murine uterine luminal epithelium. *Cell Tissue Res* 249, 533
- Polyak K, Xia Y, Zweier JL, Kinzler KW, Vogelstein B (1997) A model for p53-induced apoptosis. *Nature* 389, 300
- Quantin B, Breathnach R (1988) Epidermal growth factor stimulates transcription of the *c-jun* proto-oncogene in rat fibroblasts. *Nature* 334, 538
- Quarby VE, Korach KS (1984) The influence of 17 $\beta$ -estradiol on patterns of cell division in the uterus. *Endocrinol* 114, 694
- Rahmsdorf HJ, Shonthal A, Angel P, Litfin M, Ruther H, Herrlich P (1987) Posttranscriptional regulation of *c-fos* mRNA expression. *Nucleic Acids Res* 25, 1643
- Ransone LJ, Visvader J, Wamsley P, Verma I (1990) Trans-dominant negative mutants of Fos and Jun. *Proc Natl Acad Sci USA* 87, 3806
- Ransone LJ, Verma IM (1990) Nuclear proto-oncogenes *fos* and *jun*. *Rev Cell Biol* 6, 539.
- Reich NC, Levine AJ (1984) Growth regulation of a cellular tumour antigen, p53, in nontransformed cells. *Nature* 308, 199.
- Rhodes D (1997) The nucleosome core all wrapped up. *Nature* 389, 231
- Riabowol KT, Vosatka RJ, Ziff EB, Lamb NJ, Feramisco JR (1988) Microinjection of *fos*-specific antibodies blocks DNA synthesis in fibroblast cells. *Mol Cell Biol* 8, 1670
- Sandow BA, West NB, Norman RL, Brenner RM (1979) Hormonal control of apoptosis in hamster uterine luminal epithelium. *Am J Anat* 156, 15.
- Sar M, Welsch F (1999) Differential expression of estrogen receptor-beta and estrogen receptor-alpha in the rat ovary. *Endocrinol* 140, 963

- Sassone-Corsi P, Lamph WW, Kamps M, Verma IM (1988) fos associated p39 is related to nuclear transcription factor AP-1. *Cell* 54, 553
- Sato T, Fukazawa Y, Kojima H, Enari M, Iguchi T, Ohta Y (1997) Apoptotic cell death during the estrous cycle in the rat uterus and vagina. *Anat Rec* 248, 76
- Saunders PT, Maguire SM, Gaughan J, Millar MR (1997) Expression of estrogen receptor beta (ER  $\beta$ ) in multiple rat tissues visualised by immunohistochemistry. *J Endocrinol* 154, R13.
- Savouret JF, Rauch M, Redeuilh G, Sar S, Chauchereau A, Woodruff K, Parker MG, Milgrom E (1994) Interplay between estrogens, progestins, retinoic acid and AP-1 on a single regulatory site in the progesterone receptor gene. *J Biol Chem* 269, 28955.
- Schuchard M, Landers JP, Punkay Sandhu N, Spelsberg TC (1993) Steroid hormone regulation of nuclear proto-oncogenes. *Endocrine Rev* 14, 659.
- Schütte J, Minna JD, 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
- Shaulsky G, Ben-Ze'ev A, Rotter V (1990) Subcellular distribution of the p53 protein during the cell cycle of Balb/c 3T3 cells. *Oncogene* 5, 1707.
- Sheikh MS, Fornace AJ Jr (2000) Role of p53 family members in apoptosis. *J Cell Physiol* 182, 171
- Sobczak J, Mechti N, Tournier MF, Blanchard JM, Duguet M (1989) c-myc and c-fos gene regulation during mouse liver regeneration. *Oncogene* 4, 1503
- Song H, Lee M, Yu S, Park JS Identification of a transcription factor, an 80-kDa protein that interacts with the HLH recognition motif of the rat p53 promoter. *Biochem Cell Biol* 79, 153
- Soussi T, Caron de Fromental C, Breugnot C, May E (1988) Nucleotide sequence of a cDNA encoding the rat p53 nuclear oncoprotein. *Nucleic Acids Res* 16, 11384
- Spencer SJ, Cataldo NA, Jaffe RB (1996) Apoptosis in the human female reproductive tract. *Obstet Gynecol Surv* 51, 314
- Spornitz UM, Rinderknecht BP, Edelmann A, Scheidegger B, Cairoli F (1994) Ultrastructure as a basis for dating of rat endometrium. *Anat Rec* 238, 163
- Sridhar Rao K, Zanotti S, Reddy AG, Rauch F, Mannherz HG, Gupta PD (1998) Oestradiol regulated programmed cell death in rat vagina: terminal differentiation or apoptosis? *Cell Biol Int* 22, 105.
- Steinmeyer K, Maacke H, Deppert W (1990) Cell cycle control by p53 in normal (3T3) and chemically transformed (Meth A) mouse cells. I Regulation of p53 expression. *Oncogene* 5, 1691.
- Sutherland JA, Cook A, Bannister AJ, Kouzarides T (1992) Conserved motifs in Fos and Jun define a new class of activation domain. *Genes Dev* 6, 1810
- Tachi C, Tachi S, 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

- Tao W, Levine A (1999) Nucleocytoplasmic shuttling of oncoprotein Hdm2 is required for Hdm2-mediated degradation of p53. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 3077.
- Travers MT, 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.
- Van Beveren C, Van Straaten F, Curran T, Müller R, Verma I (1983) Analysis of FBJ-MuSV provirus and c-fos (mouse) gene reveals that viral and cellular fos gene products have different C termini. *Cell* 32, 1241
- Waga S, Hannon GJ, Beach D, Stillman B (1994) The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interacting with PCNA. *Nature* 369, 574.
- Wagner AJ, Kokontis JM, Hay N (1994) MYC-mediated apoptosis requires wild-type p53 in a manner independent of cell cycle arrest and the ability of p53 to induce p21<sup>waf1/cip1</sup>. *Genes & Dev* 8, 2817.
- Wang WW, Howells RD (1994) Sequence of the 5'-flanking region of the rat c-fos proto-oncogene. *Gene* 143, 261
- Wang H, Masironi B, Eriksson H, Sahlin L (1999) A comparative study of estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$  in the rat uterus. *Biol Reprod* 61, 955.
- Wasylyk C, Imler JL, Wasylyk B (1988) Transforming but not immortalizing oncogenes activate the transcription factor PEA1. *EMBO J* 7, 2475
- Wasylyk C, Wasylyk B, Heidecker G, Huleihier M, Rapp UR (1989) Expression of raf oncogenes activates the PEA1 transcription factor motif. *Mol Cell Biol* 9, 2247
- Waterman JL, Shenk JL, Halazonetis TD (1995) The dihedral symmetry of the p53 tetramerization domain mandates a conformational switch upon DNA binding. *EMBO J* 14, 512
- Webb DK, Moulton BC, Khan SA (1993) Estrogen induces expression of *c-jun* and *jun-B* protooncogenes in specific rat uterine cells. *Endocrinol* 133, 20
- Weisz A, 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, Bresciani F (1990) Estrogen stimulates transcription of *c-jun* protooncogene. *Mol Endocrinol* 4, 1041
- Weisz A, 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
- West NB, Norman RL, Sandow BA, Brenner RM (1978) Hormonal control of nuclear estradiol receptor content and the luminal epithelium in the uterus of the golden hamster. *Endocrinol* 103, 1732
- Westhof G, Bader W, Greiner-MAi E, Hatzmann W (2000) Comparison of cytosolic p53 protein levels in the female genital tract and breast, and their tumors. *Tumor Biol* 21, 123.
- Wisdom R, Johnson RS, Moore C (1999) c-Jun regulates cell cycle progression and apoptosis by distinct mechanisms. *EMBO J* 18, 188

- Wolffe AP, Pruss D (1996) Targeting chromatin disruption: transcription regulators that acetylate histones. *Cell* 84, 817
- Wu X, Levine AJ (1994) p53 and E2F-1 cooperate to mediate apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 3602.
- Yu C-L, Driggers P, Barrera-Hernandez G, Nunez SB, Segars JH, Cheng S-Y (1997) The tumor suppressor p53 is a negative regulator of estrogen receptor signaling pathways. *Biochem Biophys Res Comm* 239, 617.
- Zhao R, Gish K, Murphy M, Yin Y, Notterman D, Hoffman WH, Tom E, Mack DH, Levine AJ (2000) Analysis of p53-regulated gene expression patterns using oligonucleotide arrays. *Genes Dev* 14, 981
- Zhuang YH, Sarca D, Weisz A, Altucci L, Cicatiello L, Rollerova E, Tuohimaa P, Ylikomi T (2001) Cell type-specific induction of cyclin D and cyclin-dependent kinase inhibitor p27<sup>kip1</sup> expression by estrogen in rat endometrium. *J Steroid Biochem Mol Biol* 78, 193.
- Zörnig M, Hueber AO, Baum W, Evan G (2001) Apoptosis regulators and their role in tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta* 1551, F1.
- Zou H, Henzel WJ, Liu X, Lutschg A, Wang X (1997) Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* 90, 405

## 13. ANEXOS

### ANEXO 1

Mendoza-Rodríguez CA, Arrieta Cruz I, Rodríguez Dorantes M, Camacho Arroyo I, Cerbón M (2001) **Regulación de la transcripción por hormonas esteroides sexuales** En: Mensaje Bioquímico (Juárez MA, Pardo JP, del Arenal IP, Cea A, Piña E, ed) pp 129, Universidad Nacional Autónoma de México, México,

En este trabajo se describe el mecanismo de acción de las hormonas esteroides en la regulación de la transcripción y se dan algunos ejemplos de genes que son regulados por el receptor de estrógenos.

80. Rodríguez MA, García-Pérez RM, García-Rivera G, López-Reyes I, Mendoza L, Ortiz-Navarrete V y Orozco E. (2000) An *Entamoeba histolytica* rab-like encoding gene and protein: function and cellular location. *Mol Biochem Parasitol* 108: 199-206.
81. Saito-Nakano Y, Yasuda T, Shigeta Y, Nakazawa M, Takeuchi T y Nozaki T (2000) Identification and characterization of a rab5 homologue in *Entamoeba histolytica*. *Arch Med Res* 31: S155-S156.
82. Juárez P, Sanchez-Lopez R, Ramos MA, Stock RP y Alagon A (2000) Rab8 as a molecular model of vesicular trafficking to investigate the latter steps of the secretory pathway in *Entamoeba histolytica*. *Arch Med Res* 31: S157-S159.
83. Juárez P., Sanchez-Lopez R., Stock R.P., Olvera, A, Ramos, M.A. & Alagon, A. (2001) Characterization of the Ehrab8 gene, a marker of the late stages of the secretory pathway of *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol*. En prensa.
84. Martínez-Palomo, 1986. *Biology of Entamoeba histolytica*. En *AMEBIASIS*, Martínez-Palomo A (Editor). Elsevier, Amsterdam. Human Parasitic Series 2, 11-43.
85. Mazzucco A, Benichouf M y De Souza W. (1997) *Endoplasmic reticulum and Golgi-like elements in Entamoeba*. *Micron* 28: 241-247.
86. Vargas-Rodríguez L, Villagomez-Castro JC, Flores-Carreón A y Lopez-Romero E (1998) Identification and characterization of early reactions of asparagine-linked oligosaccharide assembly in *Entamoeba histolytica*. *Int J Parasitol* 28: 1333-1340.
87. Villagomez-Castro JC, Calvo-Mendez C, Vargas-Rodríguez L, Flores-Carreón A y Lopez-Romero E. (1998) *Entamoeba histolytica*: solubilization and biochemical characterization of dolichol phosphate mannose synthase, an essential enzyme in glycoprotein biosynthesis. *Exp Parasitol* 88: 111-120.
88. Ghosh SK, Field J, Frisari M, Rosenthal B, Mai Z, Rogers R y Samuelson J (1989) Chitinase secretion by encysting *Entamoeba invadens* and transfected *Entamoeba histolytica* trophozoites: localization of secretory vesicles, endoplasmic reticulum, and Golgi apparatus. *Infect Immun* 67: 3073-3081.

## REGULACIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN POR HORMONAS ESTEROIDES SEXUALES

Carmen Adriana Mendoza Rodríguez, Isabel Arrieta Cruz, Mauricio Rodríguez Dorantes, Ignacio Camacho Arroyo y Marco Carbón

Departamento de Biología, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, C.U. 04510, México, D.F.

Correo electrónico: macei@servidor.unam.mx

### Introducción

Uno de los fenómenos biológicos más estudiados en los últimos 20 años es el de la regulación de la expresión génica. El estudio del mecanismo de regulación de la transcripción es parte medular de este proceso y es sumamente complejo. El proceso de transcripción consiste en la síntesis de ARN a partir de los genes cuyos productos son necesarios para la síntesis de las proteínas indispensables en la estructura y el funcionamiento normal de la célula.

Existen tres ARN polimerasas, cada una de las cuales transcribe diferente grupo de genes. Los genes que codifican para los ARN ribosomales son transcritos por la

ARN polimerasa I. Los genes que se transcriben por la ARN polimerasa II, en su mayoría dan lugar a los ARN mensajeros que codifican para las proteínas que participan en el funcionamiento celular. Finalmente, los genes que codifican para la síntesis del ARN 5S y de los ARNt, que son las moléculas más pequeñas de ARN, se transcriben principalmente por la ARN polimerasa III.

Para que la ARN polimerasa II (pol II) inicie el proceso de la transcripción, es necesario llevar a cabo un proceso complejo que requiere el reconocimiento de secuencias consenso en el ADN y el reclutamiento de los factores que participan en el proceso de transcripción, como son la polimerasa, los factores generales de la transcripción (FGT), y los coactivadores y/o correpressores, que son reunidos para iniciar dicho proceso o inhibirlo.

En esta revisión se describe uno de los modelos más estudiados de la regulación de la transcripción, que es el de las hormonas esteroides sexuales (HE) a través de sus receptores. Se describirá el mecanismo de los factores que participan en el inicio de la transcripción por estas hormonas. Se darán algunos ejemplos de genes regulados por el receptor de estrógenos (RE) en forma primaria, con un curso temporal de respuesta relativamente corto (minutos), como es el gen de c-fos, un factor de transcripción que participa en la regulación de la proliferación, y otro gen que también es regulado de manera primaria, pero en forma menos rápida (minutos-horas), el receptor de progesterona. Las diferencias en el curso temporal del inicio de la transcripción están relacionadas con la complejidad en los factores o mecanismos que participan en la inducción de este fenómeno.

**Características moleculares de los receptores a hormonas esteroides**

Los esteroides sexuales llevan a cabo su función al interactuar con receptores específicos. Los receptores a hormonas esteroides se activan al unirse al ligando, funcionando como factores de transcripción. Estos receptores forman parte de una superfamilia de proteínas con un alto grado de homología. Hasta la fecha, se sabe que esta superfamilia contiene más de un centenar de miembros. Estos receptores juegan un papel importante en la señalización y diferenciación celular. La mayoría de los estudios indican que estos factores de transcripción, al interactuar con el ADN en promotores específicos de algunos genes, aumentan el reclutamiento del complejo de pre-iniciación con los factores generales de la transcripción (FGT).

Con la clonación de los genes de estos receptores a mediados de la década de los 80 se obtuvieron sus secuencias y desde un punto de vista evolutivo, se estableció la superfamilia de estas proteínas. Se identificaron tres grupos principales de receptores. Los receptores tipo I, que es el que nos ocupa, está compuesto por los receptores a hormonas esteroides: progesterina (RP), estrógenos (RE), andrógenos (RA), glucocorticoides (RG) y mineralocorticoides (RM). En el segundo o tipo II, se encuentran los receptores a hormonas tiroideas (RT), al ácido trans y cis retinico (RAR y RXR, respectivamente), y a la vitamina D (RXD). El tipo III agrupa a los llamados receptores huérfanos, para los cuales el ligando no se conoce.

Los receptores a hormonas esteroides (RS), al unirse con la hormona, promueven el crecimiento y la diferenciación celular. Estos receptores se transportan al núcleo en ausencia de ligando (de ahí que también se llamen receptores nucleares), unidos principalmente a proteínas de choque térmico (HSP). En este estado no se unen al ADN, por lo que no modifican la transcripción de los promotores específicos que normalmente reconocen. A diferencia de los receptores tipo I, los de tipo II son capaces, en ausencia de ligando, de reconocer y unirse a secuencias específicas del ADN, y frecuentemente reprimen la transcripción, fenómeno también llamado silenciamiento. Los receptores tipo I, tema central de esta revisión, se activan cuando se unen al ligando, formando homodímeros y/o heterodímeros que interactúan con secuencias palindrómicas (o elementos de respuesta) presentes en el ADN.

El análisis detallado de la estructura y la función de estos receptores ha permitido establecer características generales de los miembros de la superfamilia (Fig. 1). En forma breve se puede decir que a lo largo del receptor se encuentran diferentes funciones: en la región amino terminal (dominio A/B) se encuentra la función de activación o AF-1; en la región central (C) se encuentra el dominio de unión al ADN (o DNA binding domain -DBD), así como una región de charnela o bisagra (D), que participa en el cambio conformacional; y en la región carboxilo terminal (E) se encuentra el dominio de unión al ligando (LBD), que además tiene otras funciones.



Unión a la Hormona

Unión al ADN

Dimerización

Transactivación

Localización Nuclear

Unión HSP 90

**Figura 1. Representación esquemática de un receptor a hormonas esteroides, indicando su organización estructural y funcional. La porción central sombreada es el dominio de unión al ADN (DBD), de 66-68 aminoácidos, que define a esta superfamilia. La región negra en el extremo carboxilo terminal es el dominio de unión a la hormona (HBD) (15).**

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

93-b

El dominio AB varía tanto en tamaño como en secuencia entre los miembros de la familia de receptores a hormonas esteroides (Fig. 1). Está involucrado en la regulación de la transcripción tejido y promotor-específico (1), y en la formación de homodímeros y heterodímeros con otros factores de transcripción (2).

El dominio de unión al ADN (DBD) es la región más 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 (3). La coordinación del zinc es importante para la integridad estructural y la función de unión al ADN del DBD. Este dominio tiene dos subdominios, C1 y C2, que son codificados por dos exones separados. Cada uno de ellos está compuesto por un motivo lazo-hélice y cada uno tiene un ion zinc ligado por dos cisteínas ubicadas en el inicio del lazo y por dos cisteínas situadas en el extremo N-terminal de la  $\alpha$ -hélice. Las dos hélices se encuentran empaquetadas, una contra la otra, en un ángulo casi recto (3). Los residuos de aminoácidos de estos dos subdominios se pliegan para formar un solo dominio estructural, que contiene el motivo hélice-vuelta-hélice, presente en varias proteínas que se unen al ADN (incluyendo factores de transcripción), por lo que puede unirse al surco mayor del ADN 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 (4). Este dominio controla la interacción del ADN con el RS y, por lo tanto, la regulación del gen 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 (5).

Con excepción del RG, los receptores a hormonas esteroides están localizados en el núcleo de la célula, aun en ausencia de la hormona, y la unión del ligando induce la unión del receptor al ADN (6). La región de bisagra es una secuencia de aminoácidos básicos (lisinas y argininas) en la vecindad del segundo dedo de zinc, entre los dominios de unión al ADN y el de unión al esteroide. Se ha encontrado que esta región básica es la señal de localización nuclear (7-11).

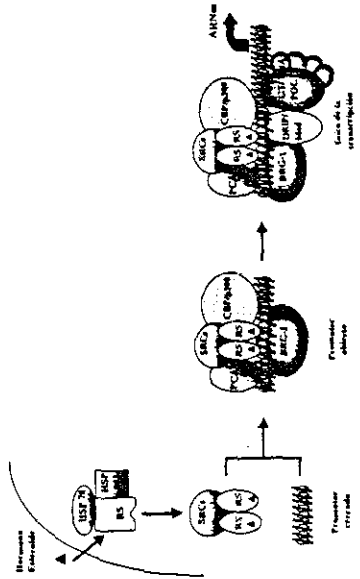
El dominio de unión al esteroide (HBD) está localizado en el extremo C-terminal de la proteína y es importante en la regulación de la actividad transcripcional del receptor, ya que en esta región se encuentra localizada otra función de activación (AF-2), la cual es muy similar a los "dominios de activación ácidos" de ciertos factores de transcripción, no relacionados con los RS. La actividad de esta región depende de la unión de ligandos agonistas (12). La formación de homodímeros es una característica general de la familia. Otra región de dimerización menos definida se traslapa con el HBD y su función parece depender de la unión de la hormona (13). Asimismo, este dominio es el responsable de la interacción con las proteínas de choque térmico (HSP) (14). En este dominio también se han identificado algunas señales de localización nuclear. Picard y Yamamoto mostraron que la función de la secuencia de localización nuclear, ubicada en el dominio de unión a la hormona del RG, es dependiente de la interacción del receptor con la hormona, lo cual explica su localización citosólica cuando no tiene unido al glucocorticóide (7).

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

93-C

**Mecanismo general de la regulación de la expresión génica por hormonas esteroides**

Como se ha descrito en los párrafos anteriores, los dominios funcionales reflejan la complejidad del proceso de activación. Sin embargo, la mayoría de los estudios realizados hasta ahora han permitido la caracterización casi completa del mecanismo de acción de estos receptores activados por el ligando (Fig. 2). En realidad, los pasos del proceso involucran: la activación del receptor por la unión a la hormona, un cambio en la conformación del receptor y su disociación de las proteínas de choque térmico, la translocación al núcleo del receptor activado (en el caso de los RG), la dimerización y su interacción con los elementos de respuesta (ERH) en el ADN. Estos ERH son secuencias palindrómicas de ADN, de 15-20 pares de bases, localizadas en el extremo 5' (o incluso dentro) de genes regulados por hormonas. Se han caracterizado cuatro clases de ERH (15). El elemento de respuesta a glucocorticoides tiene una secuencia consenso GTACAnnnTGTTCT. Los receptores para andrógenos, progesterona y mineralocorticoides también actúan por medio de este elemento de respuesta. El segundo, es la secuencia consenso del elemento de respuesta a estrógenos, AGGTACAnnnTGACCT, es muy parecida al elemento de respuesta a hormonas tiroideas, solamente que esta última no tiene los nucleótidos separadores (TCAGGTCA TGACCTGA). Tanto los homodímeros como los heterodímeros del receptor del ácido retinoico se unen al elemento de respuesta a hormonas tiroideas. El receptor huérfano COUP se une a la secuencia GTGTCAA AGGTCA, la cual representa la cuarta clase de elementos de respuesta.



**Figura 2. Mecanismo general de la regulación de la transcripción por receptores a hormonas esteroides.** Los receptores a hormonas esteroides (RS) se encuentran en un complejo inactivo, unido a las HSP, en ausencia de la hormona. Después de que se une la hormona, las HSP se disocian y el RS adopta una conformación que le permite formar dímeros y unirse a coactivadores de la familia de SRC. El complejo RS-SRC puede unirse a otros cofactores que 1) abren la estructura de la cromatina (PCAF, CBP/PPP100, BIRG-1) y 2) contribuyen a la estabilización del complejo de preiniciación (DRIP, Mediator), lo cual lleva a la activación de la transcripción.



Una fase menos caracterizada en el mecanismo de acción es la secuencia de eventos que se llevan a cabo después de que el receptor activado interactúa con el ADN. Se ha demostrado que los receptores son capaces de reclutar coreguladores. Hasta 1999, se habían identificado alrededor de 30 diferentes coactivadores o complejos *coactivadores involucrados en la activación de la transcripción regulada por receptores nucleares* (16). Muchos de estos coactivadores son bifuncionales, ya que contienen una actividad enzimática además de su dominio de coactivación. Entre las actividades enzimáticas que se han caracterizado en diferentes coactivadores se encuentran las de acetiltransferasa, metiltransferasa, ATPasa, cinasa y ubiquitin-ligasa, los cuales actúan sobre histonas, receptores, complejos de cofactores y factores generales de transcripción basal, facilitando la entrada subsiguiente de diferentes complejos y preparando al promotor para la iniciación de la transcripción. El incremento en la acetilación del extremo amino terminal de las histonas se ha correlacionado con la activación de la transcripción, mientras que la hipoaacetilación se ha asociado con la represión. La visión que prevalece actualmente es que la hiperacetilación de las histonas resulta en alteraciones de las interacciones entre las cargas positivas de las histonas y las cargas negativas del ADN, lo cual crea un ambiente más accesible a los factores de transcripción (17). Un efecto adicional de la acetilación de los residuos de lisina de las histonas es el de alterar la estructura de la cromatina (18). Algunos de los cofactores que presentan la actividad de acetiltransferasa son: p300, CBP (CREB binding protein), PCAF (p300/CBP-associated factor) y la familia de proteínas SRC (steroid receptor coactivator) (16). Otros coactivadores que alteran la estructura del nucleosoma tienen actividad de ATPasa, como los productos de los genes *brm* (brahma) y *brg-1* (brahma-related gene 1) (16). En la figura 2 se ilustra un modelo que describe el reclutamiento del complejo de preiniciación por receptores unidos a su ligando, así como la participación de las acetiltransferasas y las enzimas que modifican la cromatina. El receptor unido a su ligando se asocia con miembros de la familia de SRC y con otras acetiltransferasas de histonas (PCAF, p300 y CBP), así como con coactivadores que tienen actividad de ATPasa, capaces de modificar la estructura de la cromatina (HBRMBERG-1). Estos coactivadores efectúan alteraciones en el nucleosoma, en la región del enhancer/promotor. Subsecuentemente, se lleva a cabo la interacción con complejos coactivadores, tales como DRIP/ARC y Mediator, los cuales posiblemente establecen un vínculo directo con los factores generales de la transcripción y la ARN Pol II, lo que resulta en la estabilización del complejo de preiniciación y la activación de la transcripción (19).

#### Factores generales de transcripción

El papel de los factores generales de la transcripción ha sido bien caracterizado, sobre todo en lo relacionado con el ensamble del complejo de pre-iniciación, en genes cuyos promotores son regulados por secuencias "enhancer", que es el caso de genes regulados por hormonas esteroideas (20). Por esta razón, solamente se mencionarán en forma resumida y para mayor información se sugieren las siguientes revisiones (20,21). La mayoría de los receptores a hormonas esteroideas regulan la transcripción, vía los reguladores o enhancer, los cuales están situados hasta varios Kb arriba del sitio de iniciación de la transcripción y cuya expresión es mediada por Pol II. TFIIID es el primer factor que se une al promotor a una corta distancia del sitio de inicio de la transcripción.

Este factor consta de varias proteínas, como la proteína de unión a la caja TATA (TBP) y varios factores proteicos asociados a ésta (TAF<sub>II</sub>s). En el caso del humano, hay al menos dos subpoblaciones de TAF<sub>II</sub>s: un grupo central constituido de hTAF<sub>II</sub>s 250, 135, 100 y 28, los cuales están presentes en todos los complejos TFIID. La otra población de TAF<sub>II</sub>s es promotor específico como por ejemplo, hTAF<sub>II</sub> 30, 20 y 18 (22,23). Se sabe que, después de la unión del TFIID, el siguiente factor que se asocia es el TFIIB, el cual sólo reconoce al ADN de cadena sencilla que se localiza en la secuencia adyacente a la caja TATA, como respuesta al cambio general de contornación del ADN inducido por TBP (24). Estos cambios permiten la asociación de TFIIF- $\alpha$ , seguido de la asociación de la Pol II al complejo (25). Mientras que esta descripción implica una asociación paulatina de los FGTs, hay evidencia reciente que sugiere que existen complejos preformados de diversos FGTs con la Pol II (26). Los receptores nucleares, junto con sus coreguladores, influyen en la velocidad de ensamblaje de los FGTs y de esta forma, controlan la transcripción de promotores hormono-regulados.

La transcripción de genes específicos regulados por hormonas esteroideas permite la síntesis de dos tipos de proteínas: las que tienen una función estructural o enzimática en la célula o fuera de ella y las proteínas que sirven como factores de transcripción. A continuación describiremos algunos factores de transcripción regulados por estrogénos, los cuales están involucrados en el control de procesos tan complejos como son la proliferación y la diferenciación celular.

#### Regulación de la proliferación y la diferenciación celular por estrogénos: regulación de la expresión del gen *c-fos* y RP por estradiol en diferentes tejidos blanco de la rata hembra

##### A. regulación de la expresión del gen de *c-fos* por estradiol

Los estrogénos tienen un papel fundamental en el crecimiento, desarrollo y sobrevivencia de diversos tejidos. En el útero de los mamíferos, los estrogénos inducen la replicación del ADN y la proliferación de este tejido (27-29). No se conoce bien el mecanismo por medio del cual llevan a cabo esta función. Sin embargo, se sabe que modifica la expresión de múltiples genes, entre los cuales podemos citar al RP (30, 31), al factor de crecimiento epidérmico (32, 33), al factor de crecimiento parecido a insulina (34), así como diferentes proto-oncogenes como *c-fos* (35-37), *c-jun*, *jun-B*, *jun-D* (38-40), *c-myc* y *n-myc* (41-43). Las proteínas Fos/Jun forman parte del factor de transcripción llamado proteína activadora 1 o complejo AP1, cuya función es mediar la diferenciación y proliferación celular. El gen de *c-fos*, al igual que muchos genes, contiene en su promotor secuencias consenso para la unión del receptor de estrogénos, además de otras secuencias, como las de regulación por AMPc, lo que sugiere que dicho promotor puede ser multi regulado (44-46).

Para explorar el papel de *c-fos* en la regulación de la proliferación, se utilizó el modelo de la rata ovariectomizada, la cual presenta proliferación de los epitelios del endometrio, 24 horas después de recibir una sola dosis de estradiol (5  $\mu$ g/100 g peso

corporal) (27). Las ratas tratadas se sacrificaron a diferentes tiempos después de la administración de estradiol y se obtuvo el útero para la extracción de ARNm total. Se verificó su integridad y después de cuantificarlo, se usó para estudiar la expresión de c-fos a diferentes tiempos, después de la administración de estradiol.

La expresión de c-fos se evaluó por medio de Northern blot y de transcriptasa inversa acoplada a PCR. Como se puede observar en la figura 3, el ARN mensajero de c-fos aumenta después de una hora de la administración de estradiol, en comparación a lo observado en los animales del grupo control, y se mantiene elevado, al menos por seis horas (47). Este es un ejemplo de regulación primaria, en donde, sin demora, se observa un incremento en la síntesis o acumulación de ARNm. Es una regulación típica primaria porque ocurre en un periodo de tiempo en el que la hormona pasa al torrente circulatorio, llega a la célula y entra al núcleo, ejerciendo su función.

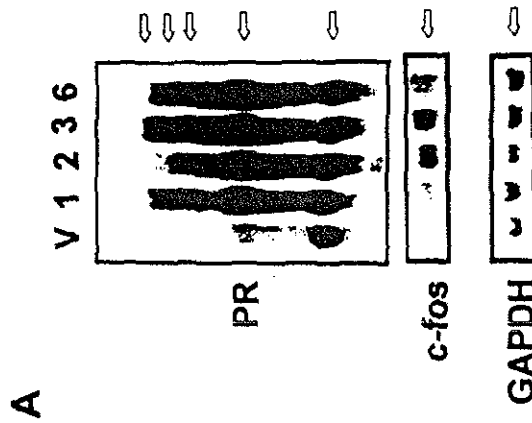


Figura 3. Regulación de la expresión de c-fos y RP por estradiol en el útero de la rata. Northern blot del ARNm de c-fos y del RP del útero de ratas ovariectomizadas tratadas con vehículo (V) o estradiol (5 µg/100 g peso corporal) por 1, 2, 3 y 6 horas. GAPDH fue usado como gen de expresión constitutiva.

El efecto del estradiol en la expresión del gen de c-fos se puede evaluar por otra técnica, como es la hibridación *in situ*, la cual permite determinar el tipo celular que expresa este ARNm, en respuesta al estradiol (Fig. 4). Véase el efecto del estradiol sobre la expresión del ARNm de c-fos en el útero y en las células epiteliales del lumen y de las glándulas del endometrio (Fig. 4).



Figura 4. Expresión de c-fos en el útero de la rata, analizado por hibridación *in situ*. Se determinó el contenido de ARNm por hibridación *in situ* en el útero de ratas ovariectomizadas tratadas con A) estradiol o B) vehículo. La coloración oscura en el citoplasma indica la presencia del ARN mensajero de c-fos. Como se puede observar, ésta aumenta claramente en las ratas tratadas con estradiol. Las micrografías se encuentran a 200 aumentos.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

93-E

Cuando se quiere entender si la regulación de una proteína es a nivel transcripcional, los cambios en la síntesis del ARNm, generalmente, corresponden al incremento consecutivo en la síntesis de la proteína. La figura 5 muestra la expresión de la proteína Fos por inmunohistoquímica. Como se puede observar, la expresión del mensajero de c-fos fue seguido de la síntesis de la proteína, lo cual indica una clara regulación transcripcional de este gen. Esto indica que Fos está involucrado en la regulación de la proliferación celular en el útero de la rata, ya que se pudo establecer una alta correlación entre la expresión de este gen y la proliferación celular de este tejido.

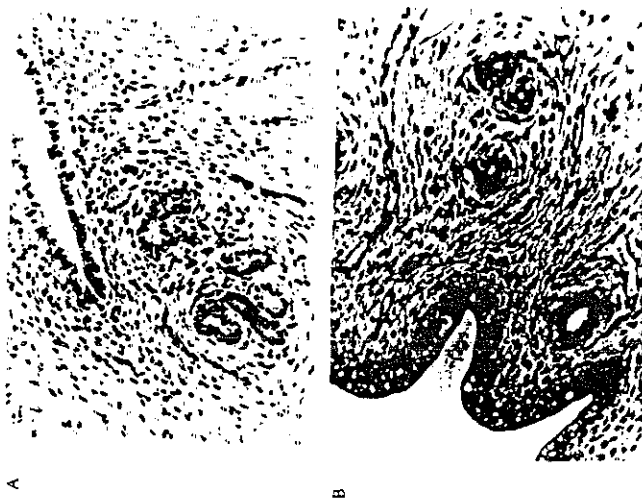


Figura 5. Inmunolocalización de la proteína de c-fos en el útero de la rata. Por inmunohistoquímica se determinó el contenido y la localización de c-fos en el útero de ratas ovariectomizadas. Ratias ovariectomizadas tratadas con A) estradiol o B) vehículo. La coloración en el núcleo indica la presencia de la proteína de c-fos. Como se puede observar, ésta aumenta claramente en las ratas tratadas con estradiol. Las micrografías se encuentran a 200 aumentos.

Las hormonas esteroideas tienen un papel fundamental en la diferenciación, desarrollo y función del cerebro de los mamíferos (48-50). Los estrógenos inducen la formación de vías neuronales durante el periodo fetal y neonatal, y modulan la actividad de conexiones neuronales en el adulto. La exposición de roedores a niveles altos de estradiol o esteroideas aromatizables, como la testosterona, durante el periodo crítico postnatal de diferenciación sexual del cerebro (que son los primeros 10 días postnatales), produce cambios en la fisiología reproductiva de los animales adultos e induce desfeminización en ratas hembras (pérdida de las características sexuales femeninas) (51). Sin embargo, no se conocen los mecanismos moleculares involucrados en la regulación de los efectos fisiológicos a largo plazo producidos por las hormonas esteroideas administradas durante el periodo crítico. La proteína Fos es un factor de transcripción que puede mediar cambios a corto y largo plazo en la función neuronal. Es por ello que se decidió estudiar su expresión en el hipotálamo, el cual es un tejido blanco para las hormonas esteroideas y tiene un papel fundamental en la conducta sexual del adulto. En la figura 6A se puede observar como el hipotálamo de animales recién nacidos responde al estradiol, incrementando el contenido del ARNm de c-fos a las dos horas de su administración. En el experimento de la figura 6B mostramos el contenido del ARNm de c-fos en el animal adulto, tanto en animales control como en animales desfeminizados. Asimismo, se muestra la respuesta a la administración de estradiol en el animal adulto normal y desfeminizado. Véase la enorme diferencia en el contenido basal del ARNm entre animales que recibieron estradiol en la etapa postnatal y los del grupo control, así como la falta de respuesta a la administración de estradiol aguda en los animales desfeminizados en comparación con los animales normales que no recibieron estradiol postnatal. El grupo control respondió, como se esperaba, con un incremento aproximado del ARNm de c-fos de diez veces respecto a su nivel basal (Fig. 6B). Esto podría ser interpretado como que las neuronas hipotalámicas de los animales desfeminizados son desensibilizadas, al menos en parte, al efecto de estradiol (52).

De la misma manera que en los experimentos realizados en el útero de la rata para determinar la regulación y localización de c-fos, confirmamos la síntesis y localización de la proteína Fos en neuronas del área preóptica del hipotálamo.

#### B. regulación de la expresión del gen del receptor a progesterona por estradiol

De manera paralela a la expresión de c-fos se estudió la expresión del receptor a progesterona en ambos modelos. El gen del RP responde de una manera exquisita a la regulación por estrógenos (30). Este modelo es muy útil para estudiar el efecto de diversos compuestos con actividad estrogénica (47).

En los experimentos en ratas ovariectomizadas, el receptor a progesterona en el útero se incrementa en función del tiempo, alcanzando su máxima expresión a las seis horas después de la administración de estradiol (Fig. 3). Nótese que a diferencia del gen c-fos, se observa un patrón de expresión complejo, observándose varios ARNm en el experimento de Northern blot, lo cual indica la presencia de varios transcritos (47).

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

93-F

Esto a su vez, indica que el procesamiento del ARNm es complejo, y por otro lado, seguramente entre estos se están detectando los ARNm que codifican para las dos isoformas del receptor. Se sabe ahora que existen al menos dos isoformas que codifican para el receptor: la isoforma A y la B. La expresión de estas isoformas varía en los diferentes tejidos y es importante para el efecto fisiológico de esta hormona.

En el caso de los animales desfeminizados también se estudió el efecto de estradiol sobre la expresión del gen de RP. Los resultados mostraron que el estradiol induce la expresión del RP en forma rápida, incrementando el contenido de ARNm. Algo muy interesante es que en el animal adulto, el contenido del ARNm en los animales normales fue mucho menor que en los que habían sido expuestos a estradiol en la etapa postnatal; más aun, cuando se les administró estradiol en forma aguda, se observó que el efecto fue inmediato en los animales normales, pero no en los desfeminizados (Fig. 7), lo que confirma los resultados obtenidos con el gen de c-fos (Fig. 6).

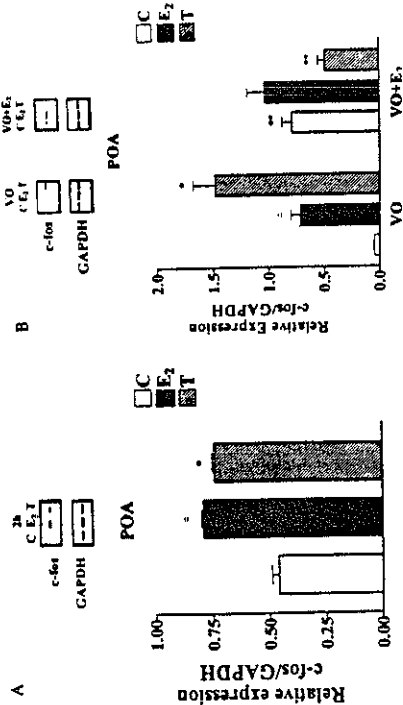


Figura 6. Regulación de la expresión de c-fos por estradiol en el hipotálamo de la rata. A) Expresión del gen de c-fos, determinado por RT-PCR, en el hipotálamo de ratas de 3 días de edad, después de haber sido tratadas por 2 horas con vehículo (C), 200 µg de 17β-estradiol (E<sub>2</sub>) o 200 µg de enantato de testosterona (T). B) Expresión del gen de c-fos en el día de la apertura vaginal, determinado por RT-PCR, en el hipotálamo de ratas desfeminizadas. Los animales fueron tratados a los 3 días de edad con E<sub>2</sub>, T o vehículo (C) y sacrificados en el día de la apertura vaginal (VO). Otro grupo de animales, pretratados como se acaba de mencionar, fueron inyectados con E<sub>2</sub> en el día de la apertura vaginal y sacrificados 3 horas después de la administración aguda de la hormona (VO + E<sub>2</sub>).

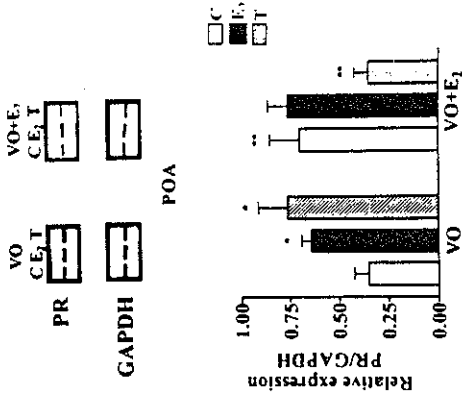


Figura 7. Regulación de la expresión de RP por estradiol en el hipotálamo de la rata. Expresión del gen de RP en el día de la apertura vaginal, determinado por RT-PCR, en el hipotálamo de ratas desfeminizadas. Los animales fueron tratados a los 3 días de edad con E<sub>2</sub>, T o vehículo (C) y sacrificados en el día de la apertura vaginal (VO). Otro grupo de animales, pretratados como se acaba de mencionar, fueron inyectados con E<sub>2</sub> en el día de la apertura vaginal y sacrificados 3 horas después de esta administración aguda (VO + E<sub>2</sub>).

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Estos resultados muestran claramente que se han modificado, a nivel genético, las neuronas que fueron expuestas al estradiol en una etapa temprana del desarrollo. Estos cambios importantes en la expresión genética condujeron al estudio del modelo de desfeminización de una manera más fina, sobre todo en lo que respecta a la maquinaria de la transcripción y al patrón de expresión genética.

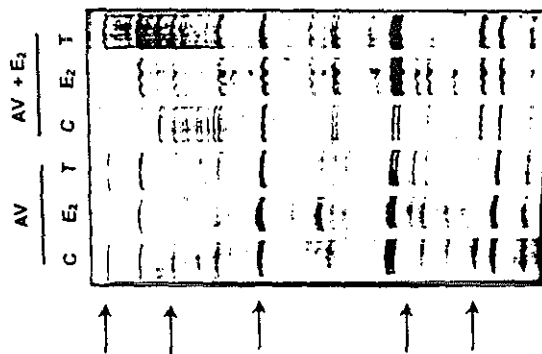


Figura 8. Detección de la expresión diferencial de los ARNm en el hipotálamo de ratas normales vs. ratas desfeminizadas. Se determinaron los patrones de expresión de los ARNm en el hipotálamo de ratas hembras normales y desfeminizadas. Los ARNm se obtuvieron de los hipotálamos de animales normales y desfeminizados y se amplificaron por RT-PCR usando oligonucleótidos aleatorios (ver referencia 53). En la figura se muestra la autoradiografía de los productos de amplificación por RT-PCR, que fueron separados en un gel de poliacrilamida al 6% con urea. Las flechas indican los RNAs diferentes entre animales normales y desfeminizados.

La manera en que se está abordando este último aspecto es usando la técnica de expresión diferencial de ARNm, a partir de los tejidos control y de los tejidos de animales desfeminizados con estradiol. Esta técnica consiste en la preparación de ARNm de los tejidos a estudiar, los cuales se someten a la amplificación con oligonucleótidos de anclaje en la región del poli-A y con oligonucleótidos originados a

Mendoza Rodríguez, C.A., Arrieta Cruz, I., Rodríguez Dorantes, M., Camacho Arroyo, I. y Cebalón, M.

partir de secuencias reguladoras en la región 3' de los genes amplificados por la ARN Pol II (53). Los resultados iniciales indican que existen múltiples genes que han cambiado su patrón de expresión y que servirán como marcadores de actividad transcripcional durante el proceso de diferenciación (Fig. 8). En este proceso se están buscando nuevos genes que participen directamente en el proceso de diferenciación del hipotálamo y que servirán para entender este complicado proceso fisiológico, que además es dimórfico. Véase la diferencia entre machos y hembras (Fig. 8). En la figura 8, se muestran los productos de algunos de los genes que aumentan su expresión y de otros que la disminuyen, los cuales están indicados por las flechas.

**Regulación de la expresión del receptor a progesterona por metilación, durante el proceso de desfeminización**

Otro de los mecanismos conocidos recientemente y que participan en la modulación de la expresión genética es la metilación de los genes en secuencias CpG en áreas del promotor (54). Este es otro de los aspectos interesantes que se han abordado en el estudio. En la actualidad se está investigando si la expresión diferencial del RP en animales normales y desfeminizados con estradiol pudiera estar relacionada con la metilación del ADN. Para esto se han diseñado oligonucleótidos que permiten amplificar las regiones promotoras del gen del RP. Este método se basa en la amplificación del ADN con oligonucleótidos nativos y con oligonucleótidos modificados, que permiten el anclaje sólo del ADN metilado; esto aunado a la PCR, permite detectar zonas de metilación específicas del gen (54). Datos actuales apuntan al hecho de que la expresión de las diferentes isoformas del RP se deben a los cambios en la metilación de sus promotores (Fig. 9).

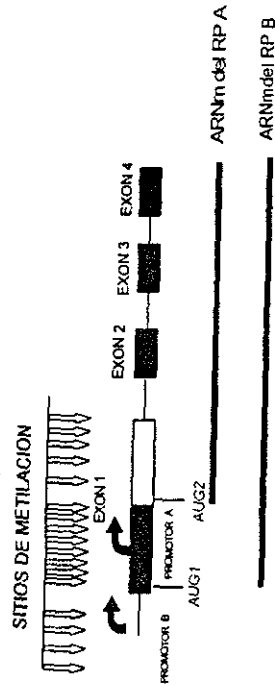


Figura 9. Características de metilación del promotor del RP. En esta figura se muestra parte de la estructura del gen del RP. Se pueden observar, señaladas por flechas, las áreas más intensas de metilación en la región del promotor de la isoforma A del RP y una zona intragénica en el exon uno. Se observan también los dos sitios de iniciación de la transcripción para las isoformas A y B, que son codificadas por dos ARN diferentes en la región 5'. El ARNm del RP A es más pequeño. El estado de metilación del gen de RP está relacionado con su nivel de expresión.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

93-H

**Conclusiones**

En este capítulo se describió brevemente el fenómeno de la expresión genética y su regulación por hormonas esteroideas. Se mencionó que la evaluación de la expresión de un gen a nivel básico, como es el estudio a nivel del contenido de ARNm y de la proteína que codifica, permite obtener información acerca de la regulación genética. Obviamente, el estudio debe llevarse a cabo de una manera sistemática y usando técnicas adecuadas. Por otro lado, hay que enfatizar que el estudio de la expresión genética a este nivel es sólo el inicio para poder abordar mecanismos más finos de regulación, como sería la participación de factores más complejos (coactivadores y/o corepresores de la transcripción) en el fenómeno de la regulación genética. En nuestro caso, se ha abordado el estudio molecular de la diferenciación sexual del hipotálamo y de la proliferación del endometrio uterino.

**Referencias**

1. 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* 9:2811-2818.
2. Landers JP y Speisberg 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* 2:19-63.
3. Harrison SC (1991). A structural taxonomy of DNA-binding domains. *Nature* 353: 715-719.
4. Truss M y Beato M (1993). Steroid hormones receptors: Interaction with deoxyribonucleic acid and transcription factors. *Endocr Rev* 14:459-479.
5. 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* 338:271-274.
6. 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* 1:291-299.
7. Picard D y Yamamoto KR (1987). Two signals mediate hormone-dependent nuclear localization of the glucocorticoid receptor. *EMBO J* 6:3333-3340.
8. Arruzo JL, Weinberg C, Cerelli G, Glasar 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* 237:268-275.
9. Green S y Chambon P (1991). The oestrogen receptor: from perception to mechanism. En: *Nuclear Hormone Receptors*. Parker MG. Academic Press. New York, pp. 15.
10. Trapman J, Klaassen P, Kuiper G, van der Korp 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* 153:241-248.

Mendoza Rodríguez, C.A., Arrieta Cruz, I., Rodríguez Dorantes, M., Camacho Arroyo, I. y Cerbón, M.

11. Guichon-Mantel A, Loosfelt H, Lescop P, Sar S, Alger M, Perrot-Appianat M y Migrom E (1989). Mechanism of nuclear localization of the progesterone receptor: evidence for interaction between monomers. *Cell* 57:1147-1154.
12. Webster NJ, Green S, Jin JR y Chambon P (1988). The hormone binding domain of the estrogen and glucocorticoid receptors contain an inducible transcription activation function. *Cell* 54:199-207.
13. Fawell SE, Lees JA, White R y Parker MG (1990). Characterization and colocalization of steroid binding and dimenzation activities in the mouse estrogen receptor. *Cell* 60:953-962.
14. Housley PR, Sanchez ER, Danielsen M, Ringold GM y Pratt W (1990). Evidence that the conserved region in the steroid binding domain of the glucocorticoid receptor is required for both optimal binding of hsp90 and protection from proteolytic cleavage. *J Biol Chem* 265:12778-12781.
15. Fuller PJ (1991). The steroid receptor superfamily: mechanisms of diversity. *FASEB J* 5:3092-3099.
16. McKenna NJ, Lanz RB y O'Malley BW (1999). Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocr Rev* 20: 321-344.
17. Wolffe AP y Pruss D (1996). Targeting chromatin disruption: transcription regulators that acetylate histones. *Cell* 84:817-819.
18. Rhodes D (1997). The nucleosome core all wrapped up. *Nature* 389:231-233.
19. McKenna NJ y O'Malley BW (2000). From ligand to response: generating diversity in nuclear receptor coregulator function. *J Steroid Biochem Mol Biol* 74: 351-356.
20. Roeder RG (1996). The role of general initiation factors in transcription by RNA polymerase II. *Trends Biosci* 21:327-335.
21. Zavel L y Reinberg D (1995). Common themes in assembly and function of eukaryotic transcription complexes. *Annu Rev Biochem* 64:533-561.
22. Jacq X, Brou C, Lutz Y, Davidson I, Chambon P y Torá L (1994). Human TAFII 30 is present in a distinct TFIID complex and is required for transcriptional activation by the estrogen receptor. *Cell* 79:107-117.
23. Mengus G, May M, Jacq X, Staub A, Torá L, Chambon P y Davidson I (1995). Cloning and characterization of hTAFII 18, hTAFII 20 and hTAFII 28: three subunits of the human transcription factor TFIID. *EMBO J* 14:1520-1531.
24. Lee S y Hahn S (1995). Model for binding of transcription factor TFIIB to the TBP-DNA complex. *Nature* 376:609-612.
25. Ha I, Roberts S, Maldonado E, Sun X, Kim LU, Green M y Reinberg D (1993). Multiple functional domains of human transcription factor IIB: distinct interactions with two general transcription factors and RNA polymerase II. *Genes Dev* 7:1021-1032.
26. Koleske AJ y Young RA (1994). An RNA polymerase II holoenzyme responsive to activators. *Nature* 368:466-469.
27. Clark BF (1971). The effects of oestrogen and progesterone on uterine cell division and epithelial morphology in spayed, adrenalectomized rats. *J Endocrinol* 50:521-528.
28. Kaye AM, Sheratzky D y Linder HR (1972). Kinetics of DNA synthesis in immature rat uterus: age dependence and estradiol stimulation. *Biochem Biophys Acta* 261:475-486.

93-I

29. Marcus GJ (1974). Mitosis in the rat uterus during the estrous cycle, early pregnancy, and early pseudopregnancy. *Biol Reprod* 10:447-452.
30. Kraus WL y Katzenellenbogen BS (1993). Regulation of progesterone receptor gene expression and growth in the rat uterus: modulation of estrogen actions by progesterone and sex steroid hormone antagonists. *Endocrinology* 132:2371-2379.
31. Savarett JF, Rauch M, Redeuilh G, Sar S, Chauthereau A, Woodruff K, Parker MG y Milgrom E (1994). Interplay between estrogens, progesterins, retinoic acid and AP-1 on a single regulatory site in the progesterone receptor gene. *J Biol Chem* 269:28955-28962.
32. DiAugustine RP, Petrusz P, Bell GI, Brown CF, Korach KS, McLachlan JA y Teng CT (1988). Influence of estrogens on mouse uterine epidermal growth factor precursor protein and messenger ribonucleic acid. *Endocrinology* 122:2355-2363.
33. Huet-Hudson YM, Chakraborty C, De SK, Suzuki Y, Andrews GK y Day SK (1980). Estrogen regulates the synthesis of epidermal growth factor in mouse uterine epithelial cells. *Mol Endocrinol* 4:510-523.
34. Murphy LJ y Ghahary A (1990). Uterine insulin-like growth factor-1: regulation of expression and its role in estrogen-induced uterine proliferation. *Endocr Rev* 11: 443-453.
35. Loose-Mitchell DS, Chiappetta C y Stancel GM (1988). Estrogen regulation of *c-fos* messenger ribonucleic acid. *Mol Endocrinol* 2:946-951.
36. Bigsby RM y Li A (1994). Differentially regulated immediate early genes in the rat uterus. *Endocrinology* 134:1820-1828.
37. 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* 136:3007-3015.
38. Weisz A, Cicatiello L, Persico E, Scalona M y Bresciani F (1990). Estrogen stimulates transcription of *c-jun* protooncogene. *Mol Endocrinol* 4:1041-1050.
39. Webb DK, Moulton BC y Khan SA (1993). Estrogen induces expression of *c-jun* and *jun-B* protooncogenes in specific rat uterine cells. *Endocrinology* 133:20-28.
40. 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 Mol Biol* 46:281-287.
41. Murphy LJ, Murphy LC y Friesen HG (1987). Estrogen induction of *N-myc* and *c-myc* proto-oncogene expression in the rat uterus. *Endocrinology* 120:1882-1888.
42. Travers MT y Knowler JT (1987). Oestrogen-induced expression of oncogenes in the immature rat uterus. *FEBS Lett* 211:27-30.
43. Weisz A y Bresciani F (1988). Estrogen induces expression of *c-fos* and *c-myc* protooncogenes in rat uterus. *Mol Endocrinol* 2:816-824.
44. 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* 18:5097-5106.
45. Hyder SM, Cram LF y Loose-Mitchell DS (1991). 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* 105:281-282.
46. Hyder SM, Stancel GM y Loose-Mitchell DS (1991). Presence of an estradiol response region in the mouse *c-fos* oncogene. *Steroids* 56:498-504.
47. Mendoza-Rodríguez CA, Camacho-Arroyo I, García GA y Cerbón MA (1999). Variations of progesterone receptor and *c-fos* gene expression in the rat uterus after treatment with norethisterone and its A-ring reduced metabolites. *Contraception* 59:339-343.
48. Alonso R y López-Coviella I (1988). Gonadal steroids and neural function. *Neurochem Res* 23:675-688.
49. McEwen BS y Alves SE (1999). Estrogen actions in the central nervous system. *Endocr Rev* 20:279-307.
50. Natfollin F, MacLusky NJ, Leranah CZ, Sakamoto HS y Garcia-Segura LM (1988). The cellular effects of estrogen on neuroendocrine tissues. *J Steroid Biochem* 30:195-207.
51. Arnold AP y Gorski RA (1984). Gonadal steroid induction of structural sex differences in the central nervous system. *Ann Rev Neurosci* 7:413-442.
52. Arrieta I, Camacho-Arroyo I, Mendoza-Rodríguez CA y Cerbón MA (2000). *c-Fos* gene expression pattern in the hypothalamus and the preoptic area of defeminized rats. *Brain Res* 867:100-106.
53. Liang P y Pardee AB (1992). Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* 257:967-971.
54. Sasaki M, Dharia A, Oh BR, Tanaka Y, Fujimoto S y Dahiya R (2001). Progesterone receptor B gene inactivation and CpG Hypermethylation in human uterine endometrial cancer. *Cancer Res* 61: 97-102.

## ANEXO 2

Mendoza-Rodríguez CA, Cerbón MA (2001) **El gen supresor de tumores p53: mecanismo de acción en la proliferación y muerte celular.** Rev Inv Clín 53, 266

En este trabajo se describe la estructura y función de p53 y sus alteraciones durante el cáncer. Así mismo, se describe su mecanismo de acción en la proliferación y muerte celular.



# El gen supresor de tumores *p53*: mecanismos de acción en la proliferación y muerte celular

Carmen Adriana Mendoza-Rodríguez,\* Marco Antonio Cerbón\*

\* Departamento de Biología Facultad de Química UNAM México D F

*The tumor suppressor p53:  
mechanism of action in proliferation and cell death*

RESUMEN

ABSTRACT

*Normal development is a balance process, which includes proliferation and cell death. Indeed both proliferation and apoptotic cell death are very complex processes that involve the participation of many genes. In both events, the tumor suppressor p53 is one of the most important and studied genes. This transcription factor activates several genes, which results in the arrest of the cellular cycle and cellular repair or apoptosis. Many are the signals that activate p53 function including DNA damage by  $\gamma$  or ultraviolet radiation and chemical agents and hypoxia, among others. When p53 is activated it can either induce the expression of p21 (Waf1, Cip-1), which participates in the cellular arrest between G1-S transition, or the expression of bax, PIGs, IGF-BP3, Fas, FasL and DR5. The former genes participate in the cascade of events that induce apoptosis. Cellular arrest or apoptosis depends of the degree of cellular damage. The final outcome of the different mechanisms of action of p53 is to maintain the genomic stability of the cell. Thus, the absence of this protein contributes to genomic instability, the accumulation of mutations and increased tumorigenesis. It has been demonstrated that p53 present mutations in 50-55 % of all types of reported human cancer. These mutations are primary located in DNA binding domain of the protein, which results in the loss of its biological activity. Frequently, tumors that present wild type p53 have a better response towards therapy than those that present p53 mutations. This review is focused on the knowledge of the normal p53 cellular pathways and their alterations in cancer. It is clear that the understanding of p53 function in the development of this pathology may give new insights in future therapeutic strategies including gene therapy for cancer.*

El desarrollo normal es un proceso equilibrado que incluye la proliferación y la muerte celular. Los procesos de proliferación y muerte celular por apoptosis son muy complejos e involucran la participación de muchos genes. En ambos procesos, el gen supresor *p53* es uno de los genes más importantes y estudiados. Este factor de transcripción activa una variedad de genes que resulta en la inhibición de la progresión del ciclo celular y la reparación celular o en apoptosis. Las señales que activan la función de *p53* incluyen: daño al ADN por agentes químicos o radiación  $\gamma$  y ultravioleta e hipoxia, entre otros. Cuando *p53* es activado induce la expresión de *p21* (*Waf1*, *Cip-1*), el cual participa en la inhibición de la progresión del ciclo celular durante la fase G1, o la expresión de *bax*, *PIGs*, *IGF-BP3*, *Fas*, *FasL* y *DR5*. Estos últimos participan en la cascada de eventos que inducen apoptosis. Cuando una célula es dañada, depende de la intensidad del daño el que se detenga el ciclo o se induzca apoptosis. El resultado final de los diferentes mecanismos de acción de *p53* es mantener la estabilidad genómica de las células. Por lo tanto, la deficiencia de esta proteína contribuye a la inestabilidad genómica, a la acumulación de mutaciones y a la aceleración de la tumorigénesis. *p53* se encuentra mutado en 50-55 % de todos los tipos de cáncer en humanos. Estas mutaciones se encuentran localizadas principalmente en el dominio de unión al ADN, lo que resulta en la pérdida de su actividad biológica. Se ha demostrado que algunos tipos tumorales que responden bien a la quimioterapia y radioterapia presentan *p53* tipo silvestre, a diferencia de los que presentan *p53* mutado. Este trabajo describe la estructura y función de *p53* y sus alteraciones durante el cáncer. El conocimiento de la participación de *p53* en el desarrollo de esta enfermedad puede dar un nuevo enfoque en el diseño de nuevas estrategias en el tratamiento del cáncer, incluyendo la terapia génica.

**Key words.** Tumor suppressor p53 Apoptosis Cell cycle. Cancer Gene expression

**Palabras clave.** Gen supresor de tumores p53 Apoptosis Ciclo celular. Cáncer Expresión génica

## INTRODUCCIÓN

En la sociedad moderna, el cáncer es la enfermedad más temida y una de las más frecuentes. Esta enfermedad ha sustituido en frecuencia de mortalidad a las enfermedades infecto-contagiosas en países industrializados. Hoy en día se sabe que la célula, que representa la unidad funcional de todos los tejidos, vive bajo un constante estrés ya que posee una maquinaria bioquímica que no sólo genera productos de utilidad para su supervivencia, sino que también genera productos intermediarios que frecuentemente representan insultos químicos que bajo ciertas circunstancias podrían llevarla a la muerte. En realidad el equilibrio de la célula resulta del balance entre la producción y utilización de los productos nutritivos y los insultos bioquímicos que se generan y los mecanismos que le permiten la desintoxicación.

Desde su descubrimiento en 1979,<sup>1</sup> el gen supresor de tumores *p53* y su proteína se han convertido en el centro de intensos estudios. Más del 50 % de los cánceres humanos presentan mutaciones en este gen y en la actualidad existe un catálogo de sus mutaciones en más de 50 diferentes tejidos y tipos celulares.<sup>2</sup> La activación de la proteína *p53* debido a estrés celular, permite a la proteína funcionar como factor de transcripción, activando una serie de genes cuya acción concertada resulta en la inhibición de la progresión del ciclo celular para la reparación de la célula o la inducción de apoptosis.<sup>3</sup> Así mismo, se ha informado que *p53* participa en otros procesos como la replicación y reparación del ADN, la diferenciación y la senescencia,<sup>3</sup> pero debido a la extensión de este trabajo solamente revisaremos los mecanismos de activación de *p53* y su participación durante el ciclo celular y la apoptosis.

### ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE P53

La proteína *p53* es un factor de transcripción que aumenta la frecuencia de transcripción de diversos genes que participan en la reparación, muerte celular o ambas, entre otros. La proteína humana *p53* contiene 393 aminoácidos y ha sido dividida estructural y funcionalmente en cuatro dominios los cuales desempeñan un papel muy preciso. El extremo amino terminal contiene el dominio de activación de la transcripción, el cual interactúa con la maquinaria basal de la transcripción regulando positivamente la expresión de diferentes genes (*p21/Waf1*, *MDM2*, *GADD45*, *ciclina G*, *bax*, *PIGs* e *IGF-BP3*, entre otros). Se ha observado que los aminoácidos F19,

L22 y W23 se requieren para la activación de la transcripción de esta proteína *in vivo*.<sup>4</sup> Estos son responsables de la interacción con la proteína de unión a la caja TATA (TBP) y con otros factores asociados a TBP.<sup>5-7</sup> La actividad transcripcional de *p53* es regulada negativamente por la proteína E1B-55Kd de adenovirus y la proteína MDM2 de humano a través de la interacción con los aminoácidos 22 y 23.<sup>4</sup> Dos eventos de fosforilación de *p53* en serinas son determinantes para la activación de esta proteína.<sup>8</sup> La fosforilación de la serina 20 por la proteína Chk2 (la cual es a su vez fosforilada por la cinasa ATM) induce la disociación de *p53* de MDM2, evitando que sea transportada al citoplasma donde se degrada. La S15 es fosforilada por dos diferentes cinasas, ATM y ATR. Esta fosforilación induce la interacción con CBP/p300, la cual acetila varios residuos de lisina del extremo carboxilo terminal, como se explica más adelante.

El dominio de unión al ADN de *p53* ocupa casi 2/4 partes de la proteína y se encuentra ubicado entre los residuos 102 a 292. La proteína tetramétrica de *p53* (dos dímeros) se une a cuatro repeticiones de una secuencia consenso del ADN: 5'-PuPuPuC(A/T)-3'. Esta secuencia se repite en dos pares, cada uno arreglada como repeticiones inversas.<sup>9</sup> En 50% de los tumores humanos se han detectado mutaciones puntuales en el gen *p53*,<sup>2</sup> la mayoría de éstas (>90%) se encuentran en este dominio y son responsables por la pérdida de la actividad biológica de *p53*.

La proteína nativa de *p53* es un tetrámero en solución, y los residuos 324-355 son necesarios para la oligomerización de esta proteína. Este dominio de tetramerización está unido al dominio de unión al ADN por una unión flexible de 37 aminoácidos (287-323).<sup>10</sup>

Se ha demostrado que la proteína de *p53* requiere de un cambio estructural para activar su unión al ADN. La forma latente de *p53*, que no se une al ADN, se regula por el extremo carboxilo terminal que está compuesto por 29 aminoácidos, de los cuales nueve son básicos. La unión de *p53* al ADN es activada por la fosforilación de los residuos S378 y S392 por la cinasa C y la caseína cinasa II, respectivamente, o por la desfosforilación del residuo S376, o la acetilación, por la proteína CBP/p300, de los residuos K373 y K382, o por la delección de este dominio carboxilo terminal básico y/o la unión del anticuerpo PAb421 a los residuos 370-378.<sup>8,11</sup> Estos datos han llevado a postular que el extremo carboxilo terminal determina la conversión de *p53* entre formas que están inactivas y formas que están activas para su unión al ADN, en forma alostérica.<sup>12</sup>

## INDUCCIÓN Y ACTIVACIÓN DE P53

En condiciones normales, p53 es una proteína poco abundante ya que tiene una vida media corta (~20 min) y se encuentra de forma inactiva. La degradación de p53 está mediada por MDM2<sup>13</sup> y ocurre en el citoplasma, donde se ubiquitina y se degrada por la vía dependiente del proteasoma.<sup>14</sup> Las señales que activan p53 están mediadas por diversas situaciones de estrés celular, como son diferentes tipos de daño al ADN incluyendo el rompimiento de la doble cadena del ADN por radiaciones  $\gamma$  y la presencia de intermediarios de reparación del ADN debido a radiación ultravioleta o agentes químicos, lo cual resulta en un incremento y activación de p53 en la célula. Los niveles de p53 son debidos, en general, al incremento de la vida media de la proteína y posiblemente también a la velocidad de síntesis.<sup>3</sup> Aún se desconocen las proteínas involucradas en la vía de detección del daño al ADN y activación de p53.

Además del daño directo al ADN, la hipoxia es capaz de aumentar la concentración de p53 y activar la proteína.<sup>15</sup> Se ha sugerido que este proceso representa otra vía por medio de la cual p53 lleva a cabo una función de vigilancia contra la formación de cáncer. Así mismo, se ha informado que p53 regula la expresión del gen trombospondina, el cual es un factor antiangiogénico que podría reducir el suministro de sangre a los tumores.<sup>16</sup> Existen otros mecanismos de activación de p53 menos estudiados,<sup>17</sup> como su regulación por hormonas esteroides.<sup>18,19</sup>

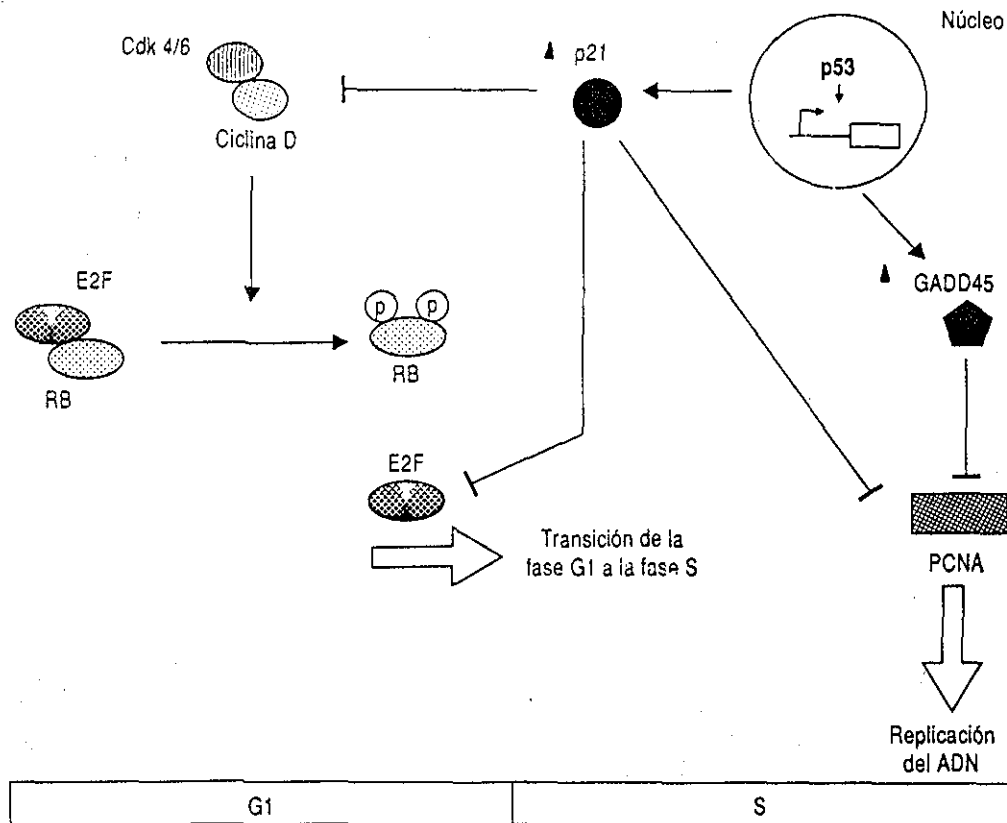
génico que podría reducir el suministro de sangre a los tumores.<sup>16</sup> Existen otros mecanismos de activación de p53 menos estudiados,<sup>17</sup> como su regulación por hormonas esteroides.<sup>18,19</sup>

## REGULACIÓN DEL CICLO CELULAR Y APOPTOSIS POR P53

Los efectos mediados por la inducción de p53 llevan a la inhibición de la progresión del ciclo celular o a la muerte celular. Ambos proveen mecanismos por medio del cual p53 funciona para controlar el daño al ADN, protegiendo a las células descendientes de la acumulación de mutaciones. Diversos experimentos han proporcionado información de las proteínas involucradas en ambas vías.

### CICLO CELULAR

La proteína p53 regula negativamente al ciclo celular en la transición de la fase G1 a la fase S por medio de p21. En la fase G1, las señales extracelulares de proliferación se transducen al núcleo y activan la maquinaria del ciclo celular. La vía de señalización mejor estudiada en esta fase es p16-ciclina D1-cdk4-Rb (Figura 1). El factor de transcripción E2F regula la expresión



**Figura 1.** Regulación del ciclo celular por p53. La activación de p53 induce la transcripción de los genes p21<sup>waf1/cip1</sup> y GADD45. p21 se une e inhibe el complejo ciclina/cdk, lo que resulta en la acumulación de Rb hipofosforilado inhibiendo la progresión del ciclo celular. Tanto p21 como GADD45 interactúan con PCNA e inhiben la replicación.

94-C

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

206

sión de diversos genes que se requieren en la fase S del ciclo celular. Rb en su estado de hipofosforilación bloquea la progresión del ciclo celular porque se une al factor de transcripción E2F. El complejo ciclina D1-cdk4 fosforila a Rb, lo que libera al factor E2F y permite la progresión del ciclo celular. Algunas formas de daño al ADN inducen la activación de *p53*, el cual induce la transcripción de *p21 (Waf1/Cip-1)*.<sup>20</sup> La proteína *p21* inhibe la actividad cinasa del complejo ciclina D1-cdk4, lo cual permite la acumulación de Rb hipofosforilado (Figura 1). Por otra parte, se ha observado que *p21* puede formar complejos con subunidades de E2F y de esta forma controla directamente la actividad de esta proteína por un mecanismo diferente a la vía descrita anteriormente.<sup>21</sup> Además, se ha informado que *p21* puede inhibir otros complejos ciclina/cdk que participan en la fase G1 (ciclina D2/cdk6) y en la fase S (ciclina E/cdk2). Otras formas por medio del cual *p21* puede regular el ciclo celular es mediante la interacción con el factor de replicación y reparación PCNA (antígeno nuclear de proliferación celular). *p21* inhibe la función de PCNA, bloqueando el paso de elongación en la replicación del ADN.<sup>22</sup> (Figura 1). Así mismo, en algunas células en cultivo la sobreexpresión del gen *GADD45* (gen inducido por *p53*) inhibe la progresión de ciclo en G1.<sup>23</sup> La proteína *GADD45* se une a PCNA e inhibe la entrada de las células a la fase S.<sup>24</sup> (Figura 1).

Otro punto en el cual *p53* puede detener el ciclo celular es en G2.<sup>25</sup> Los fibroblastos de ratones con delección de *p53 (p53-/-)*, no se detienen en G2 en respuesta a un inhibidor del huso mitótico y entran en varias rondas de síntesis de ADN sin la segregación apropiada de los cromosomas. Esto da como resultado la formación de células tetraploides y octaploides. También se ha sugerido que *p53* puede participar en la detención del ciclo celular que resulta al sobreexpresar el gen *Gas 1*, el cual bloquea la transición de G0 a S.<sup>26</sup>

## APOPTOSIS

*p53* induce apoptosis en varios tipos celulares, particularmente en las células de la línea hematopoyética.<sup>27</sup> Asimismo, diversos estímulos pueden causar apoptosis dependiente de *p53*, incluyendo daño al ADN,<sup>28</sup> expresión de oncogenes virales (i.e. E1A de adenovirus<sup>29</sup> o E7 de papilomavirus<sup>30</sup>), expresión de oncogenes celulares (i.e. *myc*<sup>31</sup>), pérdida de factores de crecimiento,<sup>32</sup> o de interleucinas,<sup>33</sup> o por la pérdida de genes supresores de tumores (i.e. *Rb*<sup>34</sup>). Sin embargo, la inducción de apoptosis también puede ocurrir por vías independientes de *p53*.<sup>35</sup>

*p53* puede inducir apoptosis tanto por medio de su función transactivadora, como por una actividad que no requiere de dicha función. Esto último se ha observado en varios tipos celulares, en donde la apoptosis mediada por *p53* e iniciada por daño en el ADN ocurre en ausencia de síntesis de RNA o proteínas<sup>36</sup> o en presencia de *p53* con deficiente función transactivadora.<sup>37</sup>

Entre los genes cuya expresión es regulada por *p53* y que pueden influir en la decisión de entrar a una vía apoptótica se encuentran *IGF-BP3*, *bax*, *bcl-2*, *PIGs* (genes inducidos por *p53*), *Fas*, *FasL* y *DRS* (Receptor de muerte 5).<sup>38-41</sup> Todos estos genes son inducidos por *p53*, a excepción de *bcl-2* que es inhibido (en algunos tipos celulares). La sobreexpresión de *Bcl-2* puede bloquear la apoptosis inducida por *p53*. *Bax* se une a *Bcl-2* y antagoniza su habilidad para bloquear la apoptosis. Así es que la síntesis de *Bax* y la inhibición de *Bcl-2* dependientes de *p53* inducen la respuesta de la célula hacia apoptosis (Figura 2). Las proteínas que conforman la familia de *Bax* y *Bcl-2* forman canales en la mitocondria, los cuales regulan su potencial de membrana y la homeostasis del volumen.<sup>42</sup> Estos canales controlan la liberación del citocromo C, el cual es esencial para la activación de Apaf-1. El citocromo C se une a Apaf-1 en presencia de nucleótidos de adenina y esta unión produce un cambio conformacional que permite que la procaspasa-9 se una a este complejo. La subsecuente oligomerización de la procaspasa-9 facilita su autoactivación, la cual desencadena la cascada de activación de caspasas. Estas proteasas degradan diversas proteínas celulares, entre las que se encuentran proteínas estructurales, cinasa y proteínas relacionadas con el ciclo celular y la reparación del ADN, lo cual finalmente lleva a la apoptosis.<sup>43,44</sup> Con relación a la acción de las caspasas se recomienda revisar el artículo de Wolf y Green<sup>45</sup> y el de Utz y Anderson.<sup>46</sup>

Los genes inducidos por *p53* o *PIGs* son 13 genes involucrados en el control redox, y son activados antes de la apoptosis mediada por *p53*. Estos datos han llevado a postular el siguiente modelo (Figura 2): *p53* induce transcripcionalmente la expresión de genes relacionados con el control redox (*PIGs*), lo que resulta en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). Estas ROS causan daño oxidativo a la mitocondria, lo cual activa la cascada de caspasas para inducir la apoptosis.<sup>40</sup>

La proteína de unión al factor de crecimiento tipo insulina 3 (*IGF-BP3*) afecta el crecimiento, y el gen que codifica para esta proteína también es regulado por *p53* (Figura 2).

de las mutaciones en *p53*, algunos tumores presentan inactivación de esta proteína debido a la amplificación del gen *MDM2* (aproximadamente 1/3 parte de todos los sarcomas)<sup>49</sup> o por la localización de *p53* en el citoplasma celular (un pequeño número de cánceres de mama y neuroblastomas)

El tratamiento de las neoplasias con radioterapia y quimioterapia resulta en daño extenso en el ADN y la activación de *p53* en estas células. En algunos modelos de células en cultivo activadas por la expresión de la proteína de adenovirus E1A, el tratamiento con radiación ionizante o con 5-fluorouracilo, etopósido o adriamicina induce apoptosis dependiente de *p53*.<sup>28</sup> De igual manera, todos los teratocarcinomas testiculares de humano y de ratón que contienen el gen de *p53* tipo silvestre,<sup>50</sup> responden muy bien (90-95% curados) a la quimioterapia con cisplatino. In vitro las células Stem de estos tumores llevan a cabo una apoptosis dependiente de *p53* en respuesta a etopósido.<sup>50</sup> Una situación similar se presenta en las leucemias linfoblásticas agudas infantiles, las cuales muy frecuentemente tienen *p53* tipo silvestre y responden bien a la quimioterapia.<sup>28</sup> La recurrencia en estos tumores, o la ineffectividad de la terapia se correlaciona bien con la presencia de mutaciones en *p53*.

Otros tumores que frecuentemente contienen mutaciones en *p53* (melanomas, cáncer de pulmón, tumores colorrectales, cáncer de próstata, de vejiga y de mama) generalmente responden pobremente a la radiación o a la quimioterapia.<sup>51</sup> Por lo tanto, no es sorprendente que en algunos casos se haya informado que las mutaciones en *p53* resultarían en una mayor recurrencia y menor sobrevida total de los pacientes.<sup>51</sup> Sin embargo, no en todos los casos existe esta buena correlación entre el estado funcional de *p53* y la respuesta al tratamiento o el pronóstico. Aún más, es interesante mencionar que algunas líneas tumorales que tienen *p53* tipo silvestre son incapaces de inhibir la progresión del ciclo en G1-S en respuesta al daño genotóxico, presentando así daño cromosómico.<sup>52</sup> Esto se podría deber a que dichas líneas tumorales presentan una serie de alteraciones que modifican diversas vías que participan en el control de la proliferación y la muerte celular.

Actualmente se encuentran en desarrollo nuevas terapias génicas que aprovechan la inducción selectiva de la apoptosis. Una estrategia para lograr la selectividad es a través de la entrada específica en el tumor de moléculas que inducen apoptosis. Por ejemplo, los vectores virales que expresan genes apoptóticos pueden ser directamente introducidos en el tumor, minimizando su captación por las células normales. Este método ha sido particularmente efec-

tivo para *p53*. La inyección intratumoral de adenovirus que expresan *p53* puede inducir apoptosis directamente y actuar junto con agentes citotóxicos anticancerígenos para promover la regresión tumoral. Actualmente se encuentra en estudios clínicos esta estrategia.<sup>53-55</sup>

Ya que las mutaciones en *p53* producen proteínas alteradas, varios grupos han intentado usar el sistema inmune para matar a las células tumorales. Esta inmunoterapia puede proveer un tratamiento específico y no tóxico para el combate del cáncer. Estos estudios se han realizado en ratones. El tratamiento con células dendríticas específicas para *p53* mutado disminuyó el crecimiento tumoral de tumores preexistentes. Asimismo, estas células dendríticas son capaces de actuar como vacunas protegiendo a los ratones contra una inyección letal de células de sarcoma y promoviendo el rechazo del tumor.<sup>56, 57</sup>

Otra estrategia específica que marca a las células tumorales toma en cuenta la ausencia de *p53* en los tumores. Un ejemplo de esto es el tratamiento con el adenovirus ONYX-015, el cual es incapaz de replicarse en células normales, pero se divide selectivamente en células que carecen de *p53*. En la ausencia de *p53*, el virus se replica seguido por la lisis celular. Por lo tanto, las células tumorales son específicamente eliminadas por el virus mientras que las células normales no son afectadas. La habilidad del virus para replicarse y esparcirse supera algunas de las limitaciones de la terapia génica, sin embargo, todavía falta determinar si esta terapia sería efectiva en el tratamiento de lesiones con metástasis.<sup>58, 59</sup>

## CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

El conocimiento de la función de *p53* ha permitido conocer varias de las vías que están alteradas en diversos tipos de cáncer. Es interesante mencionar que el conocimiento de la estructura y función de *p53* permitió el desarrollo de terapias muy eficaces en algunos tipos de tumores, particularmente aquellos en los que la proteína es normal, como es el caso del cáncer de testículo. Sin embargo, se sabe que en la aparición del cáncer se requiere que varias proteínas estén alteradas además de *p53*. El conocimiento detallado de las interacciones entre *p53* y otras proteínas, como pueden ser diversos oncogenes, nos darán una mayor información de los diversos mecanismos de control del crecimiento y muerte celular que son anormales y que modifican la función celular. Es por ello que es necesario estudiar la función normal de esta proteína en tejidos que normalmente presentan alto recambio celular, como el tubo diges-

- bermann DA Hoffman B Reed JC Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo *Oncogene* 1994; 9: 1799-805
- 42 Vander Heiden MG Chandel NS Williamson EK Schumacker PT Thompson CB Bcl-xL regulates the membrane potential and volume homeostasis of mitochondria *Cell* 1997; 91: 627-37.
- 43 Zou H Henzel WJ Liu X Lutschg A Wang X Apaf-1 a human protein homologous to *C elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3 *Cell* 1997; 90: 405-13
- 44 Sheikh MS Fornace AJ Jr. Role of p53 family members in apoptosis *J Cell Physiol* 2000; 182: 171-81
- 45 Wolf BB, Green DR Suicidal tendencies: Apoptotic cell death by caspase family proteinases *J Biol Chem* 1999; 274: 20049-52
- 46 Utz PJ, Anderson P Life and death decisions: regulation of apoptosis by proteolysis of signaling molecules *Cell Death Differ* 2000; 7: 589-602.
- 47 Midgley CA, Owens B, Briscoe CV, Brynmor T, Lane DP. Coupling between gamma irradiation, p53 induction and the apoptotic response dependent upon cell type in vivo *J Cell Sci* 1995; 108: 1843-8
- 48 Irwin M, Marin MC Phillips AC Seelan RS Smith DI, Liu W, Flores ER, Tsai KY, Jacks T, Vousden KH, Kaelin WG Jr. Role of the p53 homologue p73 in E2F-1 induced apoptosis *Nature* 2000; 407: 645-8
- 49 Oliner JD, Kinzler KW, Meltzer PS, George D, Vogelstein B Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas. *Nature* 1992; 358: 80-3.
- 50 Lutzker S, Levine AJ A functional inactive p53 protein in embryonal carcinoma cells is activated by DNA damage or cellular differentiation *Nature Med* 1996; 2: 804-10
- 51 Aas T, Borrensen AL, Geisler S, Smith-Sorensen B, Johnsen H, Vargaug JE, Akslen LA, Lonning PE Specific p53 mutations are associated with de novo resistance to doxorubicin in breast cancer patients *Nature Med* 1996; 2: 811-4.
- 52 Olivier M, Bautista S, Valles H, Theillet C Relaxed cell-cycle arrests and propagation of unrepaired chromosomal damage in cancer cell lines with wild-type p53 *Mol Carcinog* 1998; 23: 1-12
- 53 Collinet P, Lanvin D, Vereecque R, Quesnel B, Querieu D Gene therapy and ovarian cancer: update of clinical trials *J Gynecol Obstet Biol Reprod* 2000; 29: 532-7
- 54 Boulay JL, Perruchoud AP, Reuter J, Bollinger C, Herrmann R, Rochlitz C P21 gene expression as an indicator for the activity of adenovirus-p53 gene therapy in non-small cell lung cancer patients *Cancer Gene Ther* 2000; 7: 1215-9
- 55 Zeimet AG, Riha K, Berger J, Windschwendter M, Hermann M, Daxenbichler G, Marth C. New insights into p53 regulation and gene therapy for cancer. *Biochem Pharmacol* 2000; 60: 1153-63
- 56 Mayordomo JJ, Loftus DJ, Sakamoto H, De Cesare CM, Appasamy PM, Lotze MT, Storkus WJ, Appella E, DeLeo AB Therapy of murine tumors with p53 wild-type and mutant sequence peptide based vaccines. *J Exp Med* 1996; 183: 1357-65
- 57 Voss RH, Lotz C, Cellary A, Theobald M. Targeting p53, hdm2, and CD 19: vaccination and immunologic strategies *Bone Marrow Transplant* 2000; 26: S43-5.
- 58 Nemunaitis J, Ganly I, Khuri F, Arseneau J, Kuhn J, McCarty T, Landers S, Maples P, Romel L, Randlev B, Reid T, Kaye S, Kirn D Selective replication and oncolysis in p53 mutant tumors with ONYX-015, an E1B-55kD gene-deleted adenovirus in patients with advanced head and neck cancer: a phase II trial *Cancer Res* 2000; 60: 6359-66.
- 59 Heise C, Ganly I, Kim YI, Sampson-Johannes A, Brown R, Kirn D Efficacy of a replication-selective adenovirus against ovarian carcinomatosis is dependent on tumor burden, viral replication and p53 status *Gene Ther* 2000; 7: 1925-9

*Reimpresos:*

Dr. Marco Antonio Cerbón  
 Facultad de Química Departamento de Biología UNAM  
 Ciudad Universitaria  
 Deleg Coyoacán  
 04510 México D. F México  
 Tel (525) 622-3098  
 Fax (525) 616-2010  
 Correo electrónico: macer@servidor.unam.mx

Recibido el 15 de septiembre de 2000  
 Aceptado el 30 de marzo de 2001

### ANEXO 3

Mendoza-Rodríguez CA, Merchant-Larios H, Segura-Valdez ML, Moreno-Mendoza N, Cruz ME, Arteaga-López P, Camacho-Arroyo I, Domínguez R, Cerbón M (2002) **Expression of p53 in luminal and glandular epithelium during the growth and regression of rat uterus during the estrous cycle** *Molecular Reproduction and Development*: 61: 445.

En este trabajo se describe el patrón de expresión, tanto a nivel de ARNm como de la proteína, del gen supresor de tumores p53 en los epitelios uterinos durante el ciclo estral y su relación con el patrón de apoptosis de estos tipos celulares

# Expression of *p53* in Luminal and Glandular Epithelium During the Growth and Regression of Rat Uterus During the Estrous Cycle

CARMEN ADRIANA MENDOZA-RODRÍGUEZ,<sup>1</sup> HORACIO MERCHANT-LARIOS,<sup>2</sup>  
MARÍA DE LOURDES SEGURA-VALDEZ,<sup>3</sup> NORMA MORENO-MENDOZA,<sup>2</sup>  
MARÍA ESTHER CRUZ,<sup>4</sup> PAOLA ARTEAGA-LÓPEZ,<sup>4</sup> IGNACIO CAMACHO-ARROYO,<sup>1</sup>  
ROBERTO DOMÍNGUEZ,<sup>4</sup> AND MARCO CERBÓN<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., México

<sup>2</sup>Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., México

<sup>3</sup>Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., México

<sup>4</sup>Facultad de Estudios Superiores-Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., México

**ABSTRACT** It has been well recognized that epithelial cells of the rat endometrium cyclically proliferate and die during the estrous cycle. The aim of the present study was to determine *p53* expression pattern and correlate it with the apoptotic pattern of epithelial cells of the rat uterus during the estrous cycle. The *p53* mRNA and protein expression pattern was assessed by *in situ* hybridization and immunohistochemistry. The apoptotic index was determined by using terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) and electron microscopy. The highest *p53* mRNA content, detected by *in situ* hybridization, was observed on the metestrus day both in the luminal and the glandular epithelia. During this period both epithelia presented high proliferation. The content of *p53* mRNA markedly decreased in the following days, presenting its minimal values on the estrus day. The highest number of *p53* immunopositive nuclei, in both the luminal and the glandular epithelia, was also detected on the metestrus day, while the lowest one was found on estrus day. On the proestrus day, *p53* protein was predominantly detected in the glandular epithelium. However, on the estrus day, *p53* protein was detected both in the nuclei and in the cytoplasm of luminal epithelial cells, predominantly in the cytoplasm. The highest apoptotic index in both the luminal and the glandular epithelia was observed on the estrus day whereas the lowest one was observed on the proestrus day. The apoptotic index values were higher in the luminal than in the glandular epithelia. The overall results indicate that *p53* expression at both mRNA and protein levels is higher on the metestrus day when the apoptotic index is low. This suggests that *p53* should play an important physiological role during proliferative phases of the estrous cycle in the rat uterus. *Mol Reprod Dev* 61: 445–452, 2002 © 2002 Wiley-Liss Inc.

**Key Words:** apoptosis; female reproductive tract; gene regulation; uterus; *p53*

## INTRODUCTION

The rodent uterus is a classical target tissue for sexual steroid hormones. During the estrous cycle, the uterus presents morphological changes including high proliferation of both luminal and glandular epithelia and important degeneration of the epithelium after ovulation (Bertalanffy and Lau, 1963; Marcus, 1974; Spornitz et al., 1994). These events occur in response to cyclic changes in serum steroid hormone levels (Butcher et al., 1974). Cell proliferation occurs in response to estradiol ( $E_2$ ) and it is inhibited by progesterone ( $P_4$ ) (Martin et al., 1973; Kirkland et al., 1979).

Cell death in tissues is highly regulated. It is involved in shaping tissues during development (Saunders, 1966) and in counter-balancing proliferation in adult tissues (Wyllie et al., 1980). Cell death by apoptosis has been demonstrated in the uterus of several mammals, including humans (Sandow et al., 1979; Pollard et al., 1987; Spornitz et al., 1994; Spencer et al., 1996). Apoptosis has been observed in rat uterus and vagina, where an inverse correlation was established between cell death and cell proliferation using a histomorphological approach (Spornitz et al., 1994). However, there is limited systematic information about the extent of proliferation, apoptosis and expression of genes involved

Grant sponsor: Facultad de Química; UNAM; Grant sponsor: CONACyT; Grant number: 28049M

\*Correspondence to: Marco Cerbón, Facultad de Química Edif B UNAM, Ciudad Universitaria 04510, México, D.F., México.  
E-mail: mcerbon@correo.unam.mx, mcerbon85@hotmail.com

Received 30 August 2001; Accepted 12 October 2001



in these processes during the normal estrous cycle (Bourroughs et al., 2000)

It is well known that the apoptotic process involves the participation of many genes, including *p53* (Bates and Vousden, 1999). *p53* is a transcription factor that under normal conditions is thought to be involved in the maintenance of genomic stability. Indeed, this protein induces cellular arrest or apoptosis in response to genotoxic or hypoxic stress or suboptimal growth conditions (Levine, 1997). *p53* also appears to be required for normal cell proliferation (Reich and Levine, 1984; Steinmeyer et al., 1990). This gene is mutated or inactivated in more than 50% of human cancers (Hollstein et al., 1994; Hietanen et al., 2000). In spite of the great number of studies of *p53* expression in cancer derived cells and tumoral tissues, few studies about the expression of this gene have been performed in normal reproductive human female tissues (Brys et al., 2000; Westhof et al., 2000). The extent of *p53* expression seems to be organ dependent (Westhof et al., 2000). However, there is no information about *p53* expression during the menstrual cycle.

The aim of the present work was to evaluate *p53* expression pattern during the estrous cycle of the rat and to study whether this pattern correlates with the apoptotic index of the endometrium during the estrous cycle.

## MATERIALS AND METHODS

### Animals

All animal maintenance and handling was carried out in accordance with the Guidelines of the Mexican Law of Animal Protection. Intact adult female Long-Evans rats (200–250 g) were used, which presented at least four regular 4-day estrous cycles, as determined by daily vaginal smears. They were maintained under a 14:10 hr light: dark cycle, lights on from 05:00 to 19:00 hr, with food and water available ad libitum. In all experiments, groups of five rats were killed at 13:00 hr on metestrus, diestrus, proestrus, or estrus days. Uterus were dissected, trimmed of connective tissue, and immediately fixed with ice-cold 4% paraformaldehyde in phosphate buffer saline (PBS) for 2 hr. Tissues were dehydrated through a series of increasing ethanol concentrations, and finally cleared with xylene. Tissues were then embedded in paraplast. Tissue sections (5  $\mu$ m thick) were cut and mounted on silanated or poly-L-lysine coated slides. Sections were cleared of paraplast with xylene, rehydrated and processed for the techniques mentioned below.

### In Situ Hybridization

In situ hybridization was performed in 5- $\mu$ m sections, from five different animals in each day of the cycle. Briefly, rehydrated sections were incubated in 0.2 N HCl for 5 min at room temperature. After rinsing in water, slides were incubated in 1  $\mu$ g/ml proteinase K (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) for 5 min. After acetylation with acetic anhydride, the sections were

prehybridized for 1 hr in a hybridization buffer (formamide 50%, SSC 4 $\times$ , Denhardt 1 $\times$ , 0.5 mg/ml salmon sperm DNA, 0.25 mg/ml tRNA, 10% dextran sulfate). The sections were incubated at 57°C overnight with the digoxigenin-labeled antisense or sense riboprobes. The full-length rat *p53* cDNA (Soussi et al., 1988), kindly provided by Dr. Thierry Soussi (Institut Curie, Paris), was cloned into pBluescript+ (Stratagen, La Jolla, CA) transcription vector. After linearization with the appropriate restriction enzyme, digoxigenin-labeled antisense or control sense RNAs were synthesized using the Boehringer Dig RNA Labeling kit (Boehringer Mannheim Co., Indianapolis, IN), according to the manufacturer protocol. After hybridization, the sections were rinsed in 2 $\times$  sodium chloride/sodium citrate (SSC) for 1 hr at room temperature, followed by 1 $\times$  SSC for 1 hr at room temperature, 0.5 $\times$  SSC for 30 min at 37°C, and finally 0.5 $\times$  SSC for 30 min at room temperature. Tissues were rinsed in buffer 1 (150 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl, pH 7.5) and incubated overnight with a polyclonal sheep anti-digoxigenin antibody coupled to alkaline phosphatase (Boehringer Mannheim Co.). The color reaction was obtained by incubation in Fast Red chromogen (Biomedica Corp., Foster City, CA). Sections were counterstained with Mayer's Hematoxylin. Sections of the luminal and glandular epithelium were analyzed with the Metamorph Imaging System for determining the staining intensity (mean gray values) of immunopositive cells. The gray level was converted to a numerical value using a scale from 0 (white) to 255 (black). The background intensity was determined from the section incubated with the sense probe instead of the antisense probe. The background was subtracted from all values. A total of 100 cells of each cell type per section was analyzed. Three sections by animal were analyzed (n = 5 animals/day).

### Immunohistochemistry

Immunohistochemistry was performed in 5  $\mu$ m sections from five different animals in each day of the cycle. Briefly, rehydrated sections were microwaved (2 cycles of 10 min each) in 0.01 M sodium citrate, pH 6, and cooled to room temperature. Endogenous peroxidase was blocked by incubation in 3% hydrogen peroxide in PBS for 30 min. After rinsing in PBS, the slides were incubated in 0.5% Triton X-100 and nonspecific immunoglobulin binding was blocked by incubating sections in 5% bovine serum albumin (BSA) for 30 min. The sections were incubated with primary antibody (sc-1312, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA) at a 1:50 dilution (4  $\mu$ g/ml) overnight in a humidified chamber at 4°C. For negative control, two different procedures were used. In the first one, primary antibody was omitted, and in the second one primary antibody was pre-absorbed with a specific synthetic peptide (sc-1312P, Santa Cruz Biotechnology, Inc.). After washing with PBS, the sections were incubated for 2 hr at room temperature with biotin-conjugated goat anti-rabbit IgG (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) at

a 1:100 dilution, and then washed with PBS to remove unbound secondary antibody, and incubated for 1 hr at room temperature in peroxidase-conjugated avidin-biotin reagent (Santa Cruz Biotechnology, Inc). The slides were washed with PBS, developed with DAB substrate and counterstained with Mayer's Hematoxylin. Immunopositive nuclei in the glandular and luminal epithelium were determined using the Metamorph Imaging System. All the nuclei from the luminal and glandular epithelium were analyzed in each section. Three sections by animal were analyzed ( $n = 5$  animals/day).

#### Terminal Deoxynucleotidyl Transferase Mediated dUTP Nick End Labeling (TUNEL)

To detect the cells containing fragmented DNA, in situ labeling of free 3'-OH was carried out using the In Situ Cell Death Detection Kit (Boehringer Mannheim Co), following the manufacturer protocol. Briefly, rehydrated sections were incubated at room temperature for 30 min with proteinase K (20  $\mu$ g/ml in 10 mM Tris-HCl, pH 8). Sections were washed in PBS and endogenous peroxidases were inactivated with 0.3%  $H_2O_2$  in absolute methanol for 30 min at room temperature. After rinsing with PBS, sections were permeabilized with 0.1% Triton X-100 in PBS for 2 min at 4°C. Positive control sections were treated for 10 min at 37°C with DNase (2.5 U). Slides were rinsed with PBS and incubated for 1 hr at 37°C in the TUNEL reaction mixture (terminal deoxynucleotidyl transferase enzyme (TdT) with nucleotide mixture in reaction buffer). In negative controls, TdT enzyme was omitted from the reaction mixture. Slides were rinsed with PBS and then incubated with anti-fluorescein antibody Fab fragment from sheep conjugated with horseradish peroxidase for 30 min at 37°C. After rinsing with PBS, diaminobenzidine reaction was carried out for the detection of the peroxidase. Sections were counterstained with Harris Hematoxylin. The apoptotic index was estimated by counting the number of stained apoptotic cells (using the Metamorph Imaging System, Universal Imaging Corporation, Downingtown, PA) in 500 epithelial cells in three randomly selected sections of each animal ( $n = 5$  animals/day).

#### Electron Microscopy

Uteri were dissected, trimmed of connective tissue and immediately processed for electron microscopy according to the previously described protocol (Merchant-Larios et al., 1993). Tissue was fixed in Karnovsky solution, postfixed in 1%  $OsO_4$  in Zetterqvist's buffer and embedded in Epon 812. Sections of 60–90 nm were stained with uranyl acetate/lead citrate.

#### Radioimmunoassay

Specific radioimmunoassay was performed in independent serum samples from groups of five animals at 13:00 hr on metestrus, diestrus, proestrus, or estrus days. All samples were stored at  $-70^\circ C$ .  $E_2$  and  $P_4$  assessment was carried out as previously described

(Abraham, 1975). The sensitivity of the assays was 5.4 pg/ml for  $E_2$  and 8.3 ng/ml for  $P_4$ . The intra and interassay coefficients of variation were  $5.3 \pm 8\%$ ,  $6.5 \pm 10\%$ , respectively.

#### Statistical Analysis

Immunohistochemistry, in situ hybridization, TUNEL and radioimmunoassay data were analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by a Tukey's multiple comparison test. The Prism 2.01 program (Graph Pad, San Diego, CA) was used for calculating probability values.

## RESULTS

### In Situ Hybridization and Immunohistochemistry

During the estrous cycle, in situ hybridization experiments indicated that the highest staining of *p53* mRNA expression was observed on the metestrus day, both in the glandular and the luminal epithelium, significantly decreasing in the following days (Figs 1 and 2). The lowest staining of *p53* mRNA expression was observed on the estrus day in both the glandular and the luminal epithelia (Figs 1 and 2).

*p53* protein was detected by immunohistochemistry. *p53* immunoreactivity was localized in the nucleus of epithelial cells during metestrus, diestrus, and proestrus days. In contrast, on the estrus day *p53* immunostaining was predominantly detected in the cytoplasm of epithelial cells (Fig 3). As observed for *p53* mRNA stained cells, the highest number of *p53* immunoreactive nuclei were detected on the metestrus day in both the luminal and the glandular epithelium (Fig 4). In the luminal epithelium, the number of immunostained nuclei decreased during the following days of the estrous cycle, and the lowest one was observed on the estrus day (Figs 3 and 4). In the glandular epithelium the number of immunostained nuclei was similar during metestrus, diestrus, and proestrus days and significantly decreased during estrus day (Figs 3 and 4).

### TUNEL and Electron Microscopy

The apoptotic index was determined by TUNEL assay in the luminal and the glandular epithelia of the rat uterus during the estrous cycle (Fig 5A–E). The highest apoptotic index was detected both in the luminal and the glandular epithelia on the estrus day (Fig 5F). In the luminal epithelium, a marked decrease in the apoptotic index along the other days of the cycle was observed (Fig 5). In contrast, in the glandular epithelium, the apoptotic index markedly decreased on the metestrus day followed by a small increase on the diestrus day (Fig 5).

The electron microscopy data showed that both luminal and glandular epithelial death cells presented distinctive apoptotic morphology characterized by typical irregular nuclei with condensed chromatin, clumped along the nuclear membrane. The apoptotic

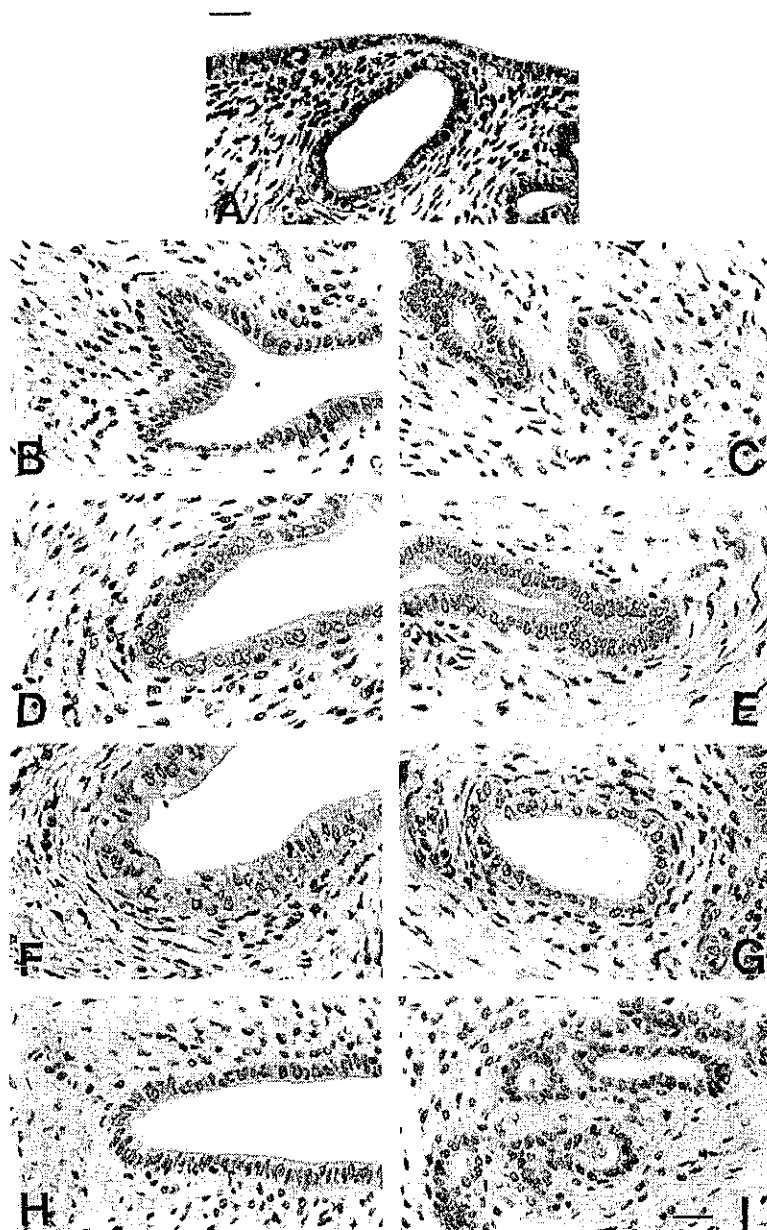


Fig. 1 Expression of *p53* mRNA in the rat uterus during the estrous cycle analyzed by in situ hybridization. A representative in situ hybridization of each day of the cycle is shown: (A) metestrus; (B and C) diestrus; (D and E) proestrus; (F and G) estrus; (H and I)

negative controls are serial sections of tissue in metestrus hybridized with the sense probe. In (A) both luminal and glandular epithelium are observed. B, D, F and H: show luminal epithelium. C, E, G and I: show glandular epithelium. Bar = 25  $\mu$ m

epithelial cells were ingested by adjacent normal cells, which contained large phagocytic vacuoles (data not shown)

#### Radioimmunoassay

$E_2$  and  $P_4$  plasma levels were determined in all studied animals, to verify the hormonal status during estrous cycle. As expected the highest  $E_2$  and  $P_4$  levels were found on the proestrus day (Fig. 6)

#### DISCUSSION

In this work, we determined the *p53* expression pattern in the luminal and the glandular epithelia of the rat uterus during the estrous cycle. *p53* expression was predominantly detected during the proliferative phases of the estrous cycle and an inverse correlation was found with the apoptotic index of the luminal and glandular epithelium.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

95-D

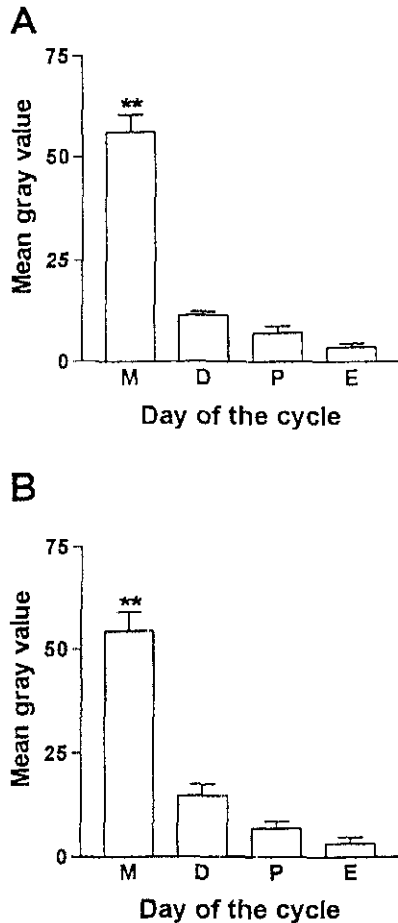


Fig 2 p53 mRNA expression level in luminal and glandular epithelium. In situ hybridization was performed in the uterus of five different animals in each day of the cycle to determine p53 mRNA content. Staining intensity (mean gray value) of immunopositive cells was evaluated in: (A) luminal epithelium and (B) glandular epithelium. M, metestrus; D, diestrus; P, proestrus; E, estrus. Results are expressed as the mean  $\pm$  SEM. \*\* $P < 0.001$  as compared with the other days of the cycle.

It has been established that during the estrous cycle, uterine cells proliferate and then undergo apoptosis. However, few studies have described cell apoptosis during the rat estrous cycle (Spornitz et al., 1994; Sato et al., 1997; Bourroughs et al., 2000). Our results indicate that the highest apoptotic index in both the luminal and the glandular epithelium occurs on the estrus day. These results are in agreement with electron microscopy data of Spornitz in which apoptosis was detected in the epithelium of the uterus of rats on the estrus day (Spornitz et al., 1994). Furthermore, our results confirm and extend the apoptosis data recently reported by Bourroughs et al. (2000), which demonstrate that the highest apoptotic rate in all uterine cell types occurs during the estrus day. Nevertheless, our results are in discrepancy with Sato study, which determined that the maximal apoptotic index of

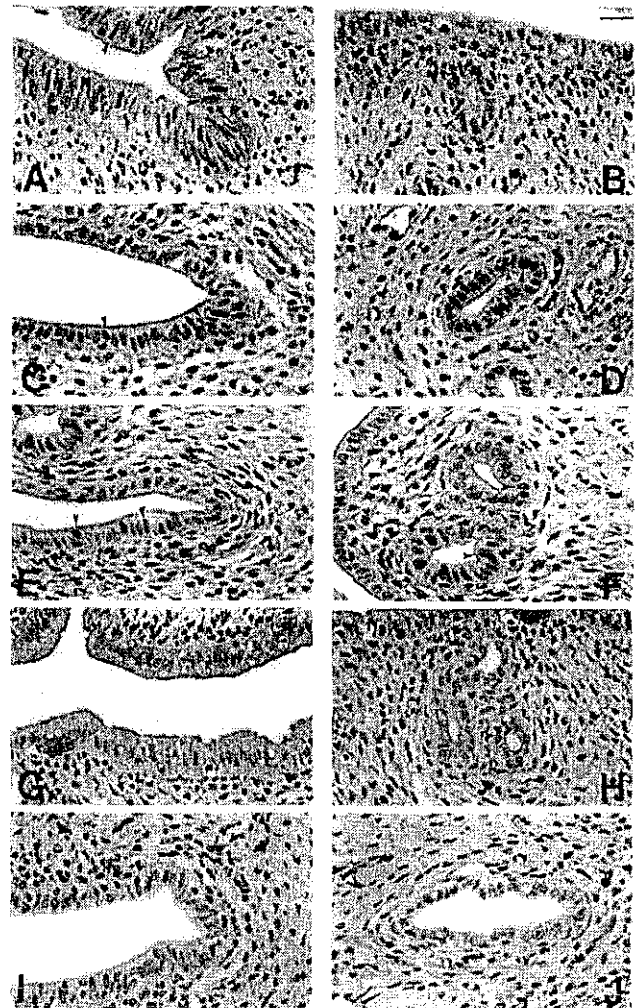


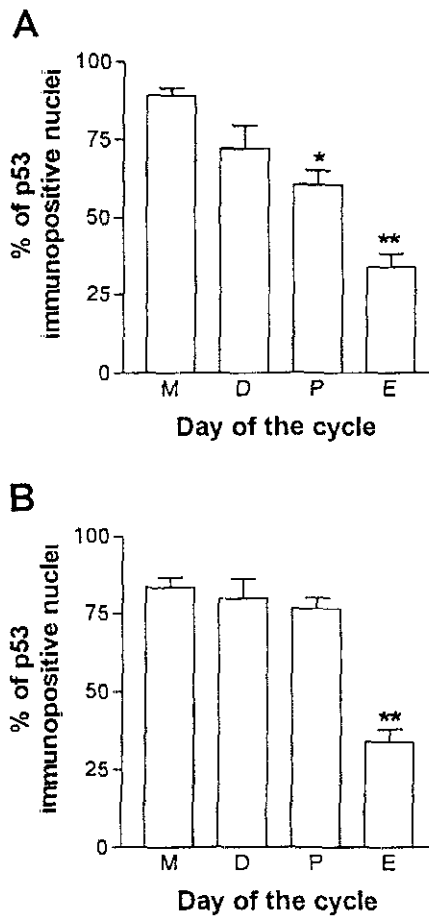
Fig 3. Immunohistochemical localization of p53 protein in the rat uterus during the estrous cycle. A representative immunohistochemistry of each day of the cycle is shown: (A and B) metestrus; (C and D) diestrus; (E and F) proestrus; (G and H) estrus; (I and J) negative controls are serial sections of tissue in metestrus in which primary antibody was pre-absorbed with a specific synthetic peptide. A, C, E, G, and I show luminal epithelium. B, D, F, H, and J show glandular epithelium. Bar = 25  $\mu$ m.

luminal epithelial cells occurred during metestrus day (Sato et al., 1997). This discrepancy may be due to the hour at which the study was performed. The maximal apoptotic index in luminal epithelial cells reported by Sato et al. was of approximately 17.5% during metestrus day and 5% in estrus day. In contrast, we observed the maximal apoptotic index (40%) on estrus day in the same cellular type. In other animal models, such as the hamster uterus, it has been reported that apoptosis also occurs during the estrus day (Sandow et al., 1979) and it is probably the result of the decline in serum  $E_2$  and the rise in  $P_4$  during this phase of the cycle (West et al., 1978).

Despite of the previously mentioned studies that described apoptosis in the uterine tissues during the

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

95-E

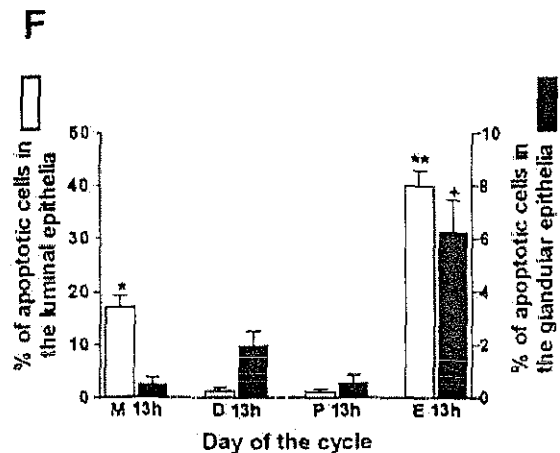
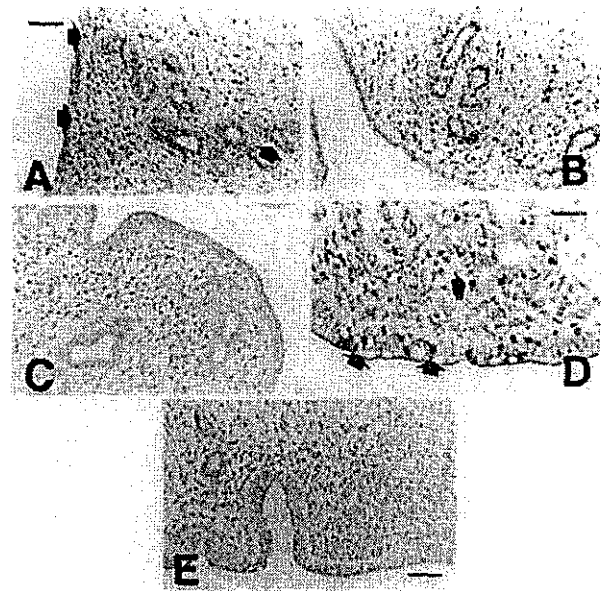


**Fig 4** p53 protein expression level in luminal and glandular epithelium. Immunohistochemistry was performed in the uterus of five different animals in each day of the cycle to determine p53 protein content. Immunopositive nuclei were determined in: (A) luminal epithelium and (B) glandular epithelium. M, metestrus; D, diestrus; P, proestrus; E, estrus. Results are expressed as the mean  $\pm$  SEM. In (A) \*\* $P < 0.001$  as compared with M and D, and  $P < 0.05$  as compared with P, \* $P < 0.01$  as compared with M. In (B) \*\* $P < 0.001$  as compared with the other days of the cycle.

estrous cycle of the rat, none of the genes involved in the apoptotic pathway, such as *p53*, have been described in this tissue under physiological conditions.

p53 is a transcription factor that participates in the regulation of the cell cycle and apoptosis (Levine, 1997). Under normal conditions, p53 protein is thought to maintain genomic stability. This protein has been described in healthy and tumoral cells from human reproductive tissues including breast, ovaries, endometrium, myometrium, and cervix (Brys et al, 2000; Westhof et al, 2000). However, there is no information about its presence in rat uterine tissue or during the estrous cycle.

In the present study, we found an increase in *p53* mRNA content on the metestrus day both in the luminal and the glandular epithelia (Figs 1 and 2). We also observed in this day the highest number of p53 immunoreactive nuclei in both epithelia (Figs 3 and 4).



**Fig 5.** Apoptotic rates of uterine epithelia during the estrous cycle determined by TUNEL method. A representative TUNEL assay of each day of the cycle is shown: (A) metestrus, (B) diestrus, (C) proestrus, (D) estrus, (E) negative control is a serial section of tissue during estrus day (TdT enzyme was omitted). Arrows indicate cells with nuclear fragmentation. Bar = 50  $\mu$ m in A, B, C, and E. In D, bar = 25  $\mu$ m. In (F) quantitation of TUNEL staining in uterine epithelia during the estrous cycle. M, metestrus; D, diestrus; P, proestrus; E, estrus. Results are expressed as the mean  $\pm$  SEM; \*\* $P < 0.001$  as compared with the other days of the cycle. \* $P < 0.01$  as compared with D and P, + $P < 0.001$  as compared with M and P, and  $P < 0.01$  as compared with D.

We observed that the highest apoptotic index occurred on the estrus day. Interestingly, p53 protein in this day of the cycle was localized predominantly in the cytoplasm of the epithelial cells. Nuclear and cytoplasmic p53 localization has been previously described (Molinari et al, 2000). In MCF-7 breast cancer cells it has been shown that  $E_2$  treatment induces cytoplasmic localization of p53 protein. Cytoplasmic localization after  $E_2$  treatment occurs 48 hr after its administration.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

95-F

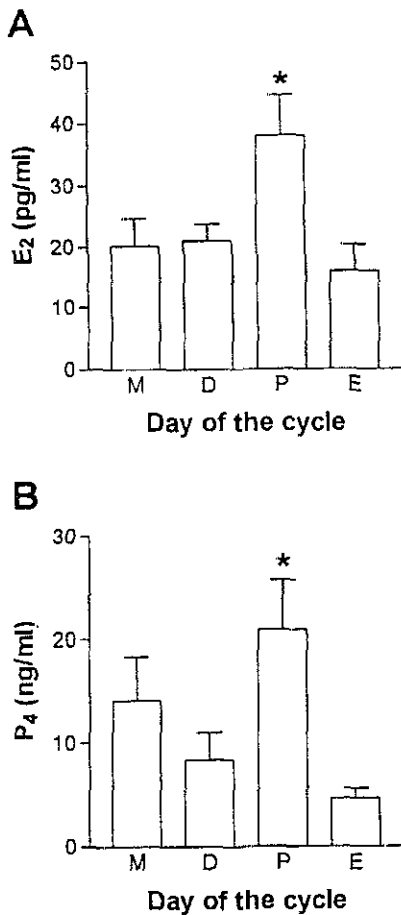


Fig 6. Serum concentrations of (A) estradiol and (B) progesterone during the estrous cycle. Steroid levels were determined by radioimmunoassay. Data are expressed as the mean  $\pm$  SEM of five animals/day of the cycle. M, metestrus; D, diestrus; P, proestrus; E, estrus. \* $P < 0.05$  vs E.

(Molinari et al, 2000). Whether the increase in p53 cytoplasmic localization observed in estrus day is due to E<sub>2</sub> increase in proestrus day deserves further investigation. Nuclear localization has been related with the normal function of the protein, whereas cytoplasmic localization is mainly due to p53 proteolysis (Levine, 1997; Molinari et al, 2000).

It is generally agreed that the regulation of p53 expression occurs at a post-transcriptional level due to an increase in the half-life of the protein and/or an increase in the rate of translational initiation of p53 mRNA in the cells (Levine, 1997). The high p53 protein level observed in the glandular epithelium during diestrus and proestrus days when mRNA levels decreased as observed by in situ hybridization, indicates a posttranscriptional regulation in this cell type.

In this study a concomitant p53 mRNA and protein expression occurred on the metestrus day in both luminal and glandular epithelium. This evidence suggests that in normal rat uterus, p53 is regulated

also at the transcriptional level. Recent studies in mouse and human cell lines indicate that p53 can be modulated at the transcriptional level by several transcription factors, which include nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), upstream stimulating factor (USF), Myc/Max, nuclear factor 1 (NF1), ying yang 1 (YY1), activator protein 1 (AP1), and Maf (Kirch et al, 1999; Hale et al, 2000; Lee et al, 2000).

It has been reported that p53 is induced by estrogens in cancer cells lines (Hurd et al, 1995; Moudgil et al, 2001). There are several reports that estrogen receptor (ER) interacts with p53. Indeed, recent data support a cross-talk between p53 and ER $\alpha$  signaling pathways (Liu et al, 1999). Both in vivo and in vitro studies indicated that ER physically interacted with p53 (Yu et al, 1997), thus suggesting that p53 is an ER interacting protein which modulates the hormone-dependent transcriptional activity of the ER (Yu et al, 1997). The cross talk between the ER and p53 may have important implications in the understanding of the biology of the uterus in which many functions are mediated via ER. However, p53 and ER interactions in this tissue deserve further investigation.

It has recently been reported that p53 participates in many other processes in addition to the well known apoptotic effects, such as: oxidative stress, cell cycle, DNA replication, signal transduction, angiogenesis, and cell migration (Zhao et al, 2000). It has been demonstrated that p53 protein is implicated in the regulation of cell growth. Indeed, an increase in synthesis and steady-state levels of p53 protein and mRNA occurs prior to DNA synthesis in late G1 indicating that p53 has a role in the progression of cells from a growth-arrested state to an actively dividing state (Reich and Levine, 1984; Steinmeyer et al, 1990). It has been demonstrated that proliferation of the rat uterine epithelia occur during the metestrus, diestrus, and proestrus days (Bertalanffy and Lau, 1963; Marcus, 1974). In the present work, we demonstrated that p53 expression is increased in the uterine epithelium during the proliferative stage of the estrous cycle. The overall results suggest that p53 should play an important physiological role during proliferative phases of the estrous cycle in the rat uterus.

#### ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Dr. Thierry Soussi (Institut Curie, Paris) for kindly providing the full-length rat p53 cDNA. Carmen Adriana Mendoza Rodríguez was supported by CONACyT doctoral grant.

#### REFERENCES

- Abraham GE 1975. Radioimmunoassays of steroids in biological fluids. *J Steroid Biochem* 6:261-270.
- Bates S, Vousden KH 1999. Mechanisms of p53-mediated apoptosis. *Cell Mol Life Sci* 55:28-37.
- Bertalanffy FD, Lau C 1963. Mitotic rates, renewal times and cytodynamics of the female genital tract epithelia in the rat. *Acta Anat* 54:39-81.
- Bourroughs KD, Fuchs-Young R, Davis B, Walker CL 2000. Altered hormonal responsiveness of proliferation and apoptosis during

- myometrial maturation and the development of uterine leiomyomas in the rat *Biol Reprod* 63:1322-1330
- Brys M, Senczuk A, Wojcik M, Krajewska VM, Jakowicki JA 2000. p53 protein detection by western blotting technique in normal and neoplastic specimens of human endometrium *Cancer Lett* 148:197-202
- Butcher RL, Collins WE, Fugo NW 1974 Plasma concentration of LH, FSH, prolactin, progesterone and estradiol-17 $\beta$  throughout the 4-day estrous cycle of the rat *Endocrinology* 94:1704-1708.
- Hale TK, Myers C, Maitra R, Kolzau T, Nishizawa M, Braithwaite AW 2000 Maf transcriptionally activates the mouse p53 promoter and causes a p53-dependent cell death *J Biol Chem* 275:17991-17999
- Hietanen S, Lain S, Krausz E, Blattner C, Lane DP 2000 Activation of p53 in cervical carcinoma cells by small molecules *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:8501-8506
- Hollstein M, Rice K, Greenblatt MS, Soussi I, Fuchs R, Sorlie I, Hovig E, Smith-Sorensen B, Montesano R, Harris CC 1994. Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines *Nucleic Acids Res* 22:3551-3555
- Hurd C, Khattree N, Alban P, Nag K, Jhanwar SC, Dinda S, Moudgil VK. 1995 Hormonal regulation of the p53 tumor suppressor protein in T47D human breast carcinoma cell line *J Biol Chem* 270:28507-28510
- Kirch HC, Flaswinkel S, Rumpf H, Brockmann D, Esche H. 1999 Expression of human p53 requires synergistic activation of transcription from the p53 promoter by AP-1, NF- $\kappa$ B and Myc/Max *Oncogene* 18:2728-2738
- Kirkland JL, LaPointe L, Justin E, Stancel GM. 1979 Effects of estrogen on mitosis in individual cell types of the immature rat uterus *Biol Reprod* 21:269-272
- Lee M, Yu S, Park J-S 2000. Biochemical characterization of a nuclear factor that binds to NF1-like elements in the rat p53 promoter *J Cell Biochem* 78:1-7
- Levine AJ. 1997. p53 the cellular gatekeeper for growth and division *Cell* 88:323-331.
- Liu G, Schwartz JA, Brooks SC 1999 p53 down regulates ER-responsive genes by interfering with the binding of ER to ERE *Biochem Biophys Res Comm* 264:359-364
- Marcus GJ 1974 Mitosis in the rat uterus during the estrous cycle, early pregnancy and early pseudopregnancy *Biol Reprod* 10:447-452
- Martin L, Das RM, Finn CA 1973 The inhibition by progesterone of uterine epithelial proliferation in the mouse *J Endocrinol* 57:549-554
- Merchant-Larios H, Moreno-Mendoza N, Buehr M 1993 The role of the mesonephros in cell differentiation and morphogenesis of the mouse fetal testis *Int J Dev Biol* 37:407-415
- Molinari AM, Bontempo P, Schiavone EM, Tortora V, Verdicchio MA, Napolitano M, Nola E, Moncharmont B, Medici N, Nigro V, Armetta I, Abbondanza C, Puca GA 2000 Estradiol induces functional inactivation of p53 by intracellular redistribution *Cancer Res* 60:2594-2597.
- Moudgil VK, Dinda S, Khattree N, Jhanwar S, Alban P, Hurd C 2001 Hormonal regulation of tumor suppressor proteins in breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 76:105-117.
- Pollard JW, Pacey J, Cheng SVY, Jordan EG 1987 Estrogens and cell death in murine uterine luminal epithelium *Cell Tissue Res* 249:533-540
- Reich NC, Levine AJ 1984. Growth regulation of a cellular tumour antigen, p53, in nontransformed cells *Nature* 308:199-201
- Sandow BA, West NB, Norman RL, Brenner RM 1979 Hormonal control of apoptosis in hamster uterine luminal epithelium *Am J Anat* 156:15-36.
- Sato T, Fukazawa Y, Kojima H, Enari M, Iguchi IY, Ohta Y 1997. Apoptotic cell death during the estrous cycle in the rat uterus and vagina *Anat Rec* 248:76-83.
- Saunders JW Jr 1966. Death in embryonic systems *Science* 154:604-612
- Soussi T, Caron de Fromental C, Breugnot C, May E 1988 Nucleotide sequence of a cDNA encoding the rat p53 nuclear oncoprotein *Nucleic Acids Res* 16:11384.
- Spencer SJ, Cataldo NA, Jaffe RB. 1996 Apoptosis in the human female reproductive tract *Obstet Gynecol Surv* 51:314-323
- Spornitz UM, Rinderknecht BP, Edelmann A, Scheidegger B, Cairoli F 1994 Ultrastructure as a basis for dating of rat endometrium *Anat Rec* 238:163-176
- Steinmeyer K, Maacke H, Deppert W 1990 Cell cycle control by p53 in normal (3T3) and chemically transformed (Meth A) mouse cells I Regulation of p53 expression *Oncogene* 5:1691-1699.
- West NB, Norman RL, Sandow BA, Brenner RM. 1978 Hormonal control of nuclear estradiol receptor content and the luminal epithelium in the uterus of the golden hamster *Endocrinology* 103:1732-1741
- Westhof G, Bader W, Greiner-MAI E, Hatzmann W 2000 Comparison of cytosolic p53 protein levels in the female genital tract and breast and their tumors. *Tumor Biol* 21:123-134
- Wyllie AH, Kerr JFR, Currie AR. 1980 Cell death: the significance of apoptosis *Int Rev Cytol* 68:251-306.
- Yu C-L, Driggers P, Barrera-Hernandez G, Nunez SB, Segars JH, Cheng S-Y 1997 The tumor suppressor p53 is a negative regulator of estrogen receptor signaling pathways *Biochem Biophys Res Comm* 239:617-620.
- Zhao R, Gish K, Murphy M, Yin Y, Notterman D, Hoffman WH, Tom E, Mack DH, Levine AJ 2000 Analysis of p53-regulated gene expression patterns using oligonucleotide arrays *Genes Dev* 14:981-993

## ANEXO 4

Mendoza-Rodríguez CA, Merchant-Larios H, Segura-Valdez ML, Moreno-Mendoza N, Cruz ME, Arteaga-López P, Camacho-Arroyo I, Domínguez R, Cerbón M (2002) **c-fos and estrogen receptor gene expression pattern in the rat uterine epithelium during the estrous cycle** Aceptado para su publicación en *Molecular Reproduction and Development*

En este trabajo se describe el patrón de expresión del proto-oncogen *c-fos* y del receptor a estrógenos en los epitelios uterinos durante el ciclo estral y su relación con el patrón de proliferación de estos tipos celulares



1 ***c-fos* and estrogen receptor gene expression pattern in the rat uterine epithelium**  
2 **during the estrous cycle**

3  
4 C Adriana Mendoza-Rodríguez<sup>1</sup>, Horacio Merchant-Larios<sup>2</sup>, Maria L. Segura-Valdez<sup>3</sup>,  
5 Norma Moreno-Mendoza<sup>2</sup>, María E. Cruz<sup>4</sup>, Paola Arteaga-López<sup>4</sup>, Ignacio Camacho-  
6 Arroyo<sup>1</sup>, Roberto Domínguez<sup>4</sup>, and Marco Cerbón<sup>1\*</sup>.

7  
8 <sup>1</sup>Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D F , México

9 <sup>2</sup>Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México,  
10 México, D.F., México

11 <sup>3</sup>Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D F , México

12 <sup>4</sup>Facultad de Estudios Superiores-Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México,  
13 México, D F , México

14  
15 \*Correspondence:

16 Marco Cerbón

17 Facultad de Química, Edif B

18 Universidad Nacional Autónoma de México

19 Ciudad Universitaria, Coyoacan 04510

20 México, D.F., México.

21 Tel. (5255) 5622-30-98

22 Fax (5255) 5616-20-10

23 E-mail: mcerbon85@hotmail.com

24 Short running title: *c-fos* and estrogen receptor gene expression in epithelial cells of rat  
25 uterus

26

26 **ABSTRACT** Different studies in ovariectomized estrogen treated animals support  
27 the idea that *c-fos* plays a role in the proliferation of uterine epithelial cells. However, these  
28 studies invite us to reassess the role played by *c-fos* in epithelial cell types of the  
29 endometrium during the estrous cycle. The present study was undertaken to determine the  
30 *c-fos* and estrogen receptor gene expression pattern in the rat uterine epithelium during  
31 the estrous cycle in which natural and cyclic changes of steroid hormones occur, and  
32 correlate these changes with the proliferation status of this cellular types. Proliferation was  
33 assessed during the estrous cycle using bromodeoxyuridine incorporation to DNA.  
34 Estrogen receptor (ER)  $\alpha$  and  $\beta$  proteins were assessed by immunohistochemistry. The  
35 regulation of *c-fos* gene expression in the uterus of intact animals during the estrous cycle  
36 was evaluated using both in situ hybridization and immunohistochemistry. Estradiol ( $E_2$ )  
37 and progesterone ( $P_4$ ) plasma levels were assessed by radioimmunoassay. The results  
38 indicated that luminal (LE) and glandular epithelia (GE) presented maximal proliferation  
39 during the metestrus (M) and the diestrus (D) days. However, during the proestrus (P) day  
40 only LE presented proliferation, and during the estrus (E) day only the stromal cells  
41 proliferated. A marked immunostaining for ER $\alpha$  was detected in both LE and GE cells  
42 during the early phases of the cycle but diminished on the P and the E day. In contrast,  
43 ER $\beta$  was undetectable in both epithelia during all stages of the cycle. The highest *c-fos*  
44 mRNA level was detected in both epithelia on the M day, followed by a significant  
45 reduction during the other days of the cycle. The highest protein content was observed on  
46 the M and D days, and the minimal value was detected on the E day. The c-Fos protein  
47 level in LE was increased during metestrus and diestrus days, presenting a high  
48 correlation with the cellular proliferation pattern of this cell type.

49 In conclusion, the overall results indicate that c-Fos protein presented a good  
50 correlation with uterine epithelial cell proliferation of LE. In the case of GE, the same  
51 tendency was observed, although no significant correlation was found. Both in LE and GE,  
52 *c-fos* mRNA did not strictly correlate with its protein levels. *c-fos* seems to have a  
53 postranscriptional regulation in uterine epithelial cells during the rat's estrous cycle.

54  
55 Keywords: *c-fos*, epithelium proliferation, estrous cycle, estrogen receptor  $\alpha$ , uterus

## 58 INTRODUCTION

59 Estrogens induce DNA replication and cellular proliferation in the uterus of  
60 mammals (Bertalanffy and Lau, 1963; Clark, 1971; Kaye et al., 1972; Marcus, 1974) by  
61 modifying the expression of several genes such as progesterone receptor (PR) (Kraus and  
62 Katzenellenbogen, 1993; Savouret et al., 1994), epidermal growth factor (DiAugustine et  
63 al., 1988; Huet-Hudson et al., 1990), insulin-like growth factor I (Murphy and Ghahary,  
64 1990), and their respective receptors (Lingham et al., 1988; Murphy and Ghahary, 1990),  
65 as well as proto-oncogenes such as *c-fos* (Loose-Mitchell et al., 1988; Bigsby and Li,  
66 1994; Nephew et al., 1995), *c-jun*, *jun-B*, *jun-D* (Weisz et al., 1990; Nephew et al., 1993;  
67 Webb et al., 1993), *c-myc* and *N-myc* (Murphy et al., 1987; Travers and Knowler, 1987;  
68 Weisz and Bresciani, 1988). The mechanism of estrogen action results from interaction  
69 with a specific nuclear ER, which is a ligand-activated transcription factor. ER-ligand  
70 complex interacts with DNA binding sites of estrogen response elements (EREs), in target  
71 genes, and this complex recruits coactivators (or corepressors) and other regulatory  
72 proteins that form the active transcription complex (McKenna et al., 1999).

73 It has been demonstrated that in immature rat uterus all cell types proliferate in  
74 respond to  $17\beta$  estradiol, whereas only epithelial cells of both glandular and luminal  
75 epithelium respond in the mature animal (Clark, 1971; Kaye et al., 1972; Nephew et al.,  
76 1995). Treatment with estradiol induces early activation of many genes that precede  
77 uterine growth, including *c-fos* and *c-jun* and *c-myc* proto-oncogenes, suggesting that they  
78 play an important role in amplifying the estradiol hormonal signal. Fos/Jun proteins  
79 constitute the activating protein-1 (AP-1) transcription factor that mediates cell  
80 proliferation, differentiation, and secretion. In the case of murine *c-fos* proto-oncogene an  
81 ERE has been characterized both in 5' and 3' regions (Hyder et al., 1991a,b) and in  
82 human *c-fos* gene, the ERE has been located in 5' (Weisz and Rosales 1990)

83 Rapid, marked and transient induction of *c-fos* in the uterus of ovariectomized rats  
84 treated with estradiol has been previously reported (Weisz and Bresciani, 1988; Mendoza-  
85 Rodriguez et al., 1999). Furthermore, other studies using similar experimental models,  
86 revealed that *c-fos* mRNA remained in uterine luminal and glandular epithelia, and the  
87 expression was not shifted to stroma in mature and immature castrated rats, and no  
88 substantial differences were found in uterine luminal and glandular epithelium (Nephew et  
89 al., 1995). These results support the idea that *c-fos* gene expression plays a role in the  
90 proliferation of uterine epithelial cells. *c-fos* expression studies in the rat uterus, however,  
91 have only been performed in ovariectomized treated animals.

92 It has been observed in the rat reproductive tissues that the expression of several  
93 genes is different in ovariectomized estrogen treated animals as compared with intact  
94 animals under physiological conditions such as the estrous cycle (Molnar and Murphy,  
95 1994; Nandha et al., 1999; Cameron et al., 2002). In the present study, the *c-fos*  
96 expression pattern was assessed in the uterus of the rat during the estrous cycle by  
97 immunohistochemistry and in situ hybridization to evaluate the cell type-specific location of  
98 both protein and mRNA encoding *c-fos*. In addition, *c-fos* gene expression at both mRNA  
99 and protein level was correlated with epithelial cell proliferation and with ER $\alpha$  and ER $\beta$   
100 isoforms expression in the rat uterus during the different phases of the estrous cycle.

## 101 102 103 **MATERIALS AND METHODS**

### 104 **Animals**

105 Intact adult female Long-Evans rats (200 - 250 g) maintained under a 14:10 h  
106 light:dark cycle with food and water available *ad libitum*, which presented at least 4 regular  
107 4-day estrous cycle, as determined by daily vaginal smears, were used. All animal  
108 maintenance and handling was carried out in accordance with the Guidelines of the  
109 Mexican Law of Animal Protection. Groups of five rats were killed at 13:00 h of diestrus,  
110 metestrus, proestrus or estrus days. Uteri were dissected, trimmed of connective tissue,  
111 and immediately fixed with ice-cold 4% paraformaldehyde in PBS for 2h. Tissues were  
112 dehydrated through a series of increasing ethanol concentrations and finally cleared with  
113 xylene. Tissues were then embedded in paraplast. Tissue sections (5  $\mu$ m thick) were cut  
114 and mounted on silanated or poly-L-lysine coated slides. Sections were cleared of  
115 paraplast with xylene, rehydrated, and processed for the techniques mentioned below.

### 116 117 **BrdU Immunostaining**

118 Two hours prior to killing, each animal received an i.p. injection of 5-bromo-2'-  
119 deoxyuridine (BrdU) in PBS at a dose of 50 mg/kg. All animals were sacrificed at 13:00 h

120 and uteri were dissected and trimmed of connective tissue. The samples were embedded  
121 in Tissue Tek and frozen at  $-70^{\circ}\text{C}$ . Sections of  $16\ \mu\text{m}$  were air-dried on microscope slides.  
122 The BrdU Labeling and Detection Kit (Boehringer Mannheim Co Indianapolis, IN) was  
123 used to detect the cells that had incorporated BrdU into DNA, following the manufacturer  
124 protocol. Briefly, the sections were rinsed in PBS and fixed in 70% ethanol (in 50 mM  
125 glycine buffer, pH 2.0) for 30 min at  $-20^{\circ}\text{C}$ . After washing with PBS, the sections were  
126 incubated with anti-BrdU mouse monoclonal antibody at a 1:10 dilution in incubation buffer  
127 (66 mM Tris buffer, 0.66 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM 2-mercaptoethanol) for 30 min at  $37^{\circ}\text{C}$ . For  
128 negative control, primary antibody was omitted. After washing with PBS, sections were  
129 incubated for 30 minutes at  $37^{\circ}\text{C}$  with TRITC-conjugated rabbit anti-mouse IgG (Sigma,  
130 St. Louis, MO) diluted 1:200 in PBS. Slides were washed with PBS and covered with  
131 DAKO Fluorescent Mounting Medium (DAKO Corporation, Carpinteria, CA). The sections  
132 were observed in a fluorescent microscope using a G-2A filter from Nikon. The proliferative  
133 rates of the LE and GE were assessed by counting the number of BrdU-positive nuclei in a  
134 section and expressed as a percent of the total number of epithelial cells. Three sections  
135 by animal were analyzed.  $N = 5$  animals per day.

### 136 137 In Situ Hybridization

138 In situ hybridization was performed in  $5\text{-}\mu\text{m}$  sections. Briefly, rehydrated sections  
139 were incubated in 0.2 N HCl for 5 minutes at room temperature. After rinsing in water,  
140 slides were incubated in  $1\ \mu\text{g}/\text{ml}$  proteinase K (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) for 5  
141 minutes. After acetylation with acetic anhydride, sections were prehybridized for 1 hour in  
142 a hybridization buffer (formamide 50%, SSC 4X, Denhardt 1X, 0.5 mg/ml salmon sperm  
143 DNA, 0.25 mg/ml tRNA, 10% dextran sulfate). Sections were incubated at  $57^{\circ}\text{C}$  overnight  
144 with the digoxigenin-labelled antisense or sense riboprobes. The full-length rat *c-fos* cDNA  
145 (Curran et al. 1987), kindly provided by Dr. Tom Curran (St. Jude Children's Research  
146 Hospital, USA), was cloned into pSP65 transcription vector. After linearization with the  
147 appropriate restriction enzyme, digoxigenin-labelled antisense or control sense RNAs were  
148 synthesized using the Boehringer Dig RNA Labeling kit (Boehringer Mannheim Co.  
149 Indianapolis, IN), according to the manufacturer protocol. After hybridization, sections were  
150 rinsed in 2X sodium chloride/sodium citrate (SSC) for 1 hour at room temperature,  
151 followed by 1X SSC for 1 hour at room temperature, 0.5X SSC for 30 min at  $37^{\circ}\text{C}$ , and  
152 finally 0.5X SSC for 30 min at room temperature. Tissues were rinsed in buffer 1 (150 mM  
153 NaCl, 100 mM Tris-HCl, pH 7.5), and incubated overnight with a polyclonal sheep anti-  
154 digoxigenin antibody coupled to alkaline phosphatase (Boehringer Mannheim Co.  
155 Indianapolis, IN). The colour reaction was obtained by incubation in Fast Red chromogen  
156 (Biomedica Corp., Foster City, CA). Sections were counterstained with Mayer's  
157 Hematoxylin. Sections of the luminal and glandular epithelium were analyzed with the  
158 Metamorph Imaging System (Universal Imaging Corporation, Downingtown, PA) for  
159 determining the staining intensity (mean gray values) of immunopositive cells. The gray  
160 level was converted to a numerical value using a scale from 0 (white) to 255 (black). The  
161 background intensity was determined from the section incubated with the sense probe  
162 instead of the antisense probe. The background was subtracted from all values. A total of  
163 100 cells of each cell type per section were analyzed. Three sections by animal were  
164 analyzed.  $N = 5$  animals per day.

165  
166

### Immunohistochemistry

167  
 168 Immunohistochemistry was performed in 5  $\mu$ m sections. Briefly, rehydrated sections  
 169 were microwaved (2 cycles of 10 min each) in 0.01 M sodium citrate, pH 6 and cooled to  
 170 room temperature. Endogenous peroxidase was blocked by incubation in 3% hydrogen  
 171 peroxide in PBS for 30 minutes. After rinsing in PBS, the slides were incubated in 0.5 %  
 172 Triton X-100, and non specific immunoglobulin binding was blocked by incubating sections  
 173 in 5 % bovine serum albumine (BSA) for 30 minutes. Sections were incubated with primary  
 174 antibody (c-Fos: sc-52, ER $\alpha$ : sc-542, ER $\beta$ : sc-6821; Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa  
 175 Cruz, CA) at a 1:50 dilution (4  $\mu$ g/ml) overnight in a humidified chamber at 4°C. For  
 176 negative control, two different procedures were used. In the first one, primary antibody was  
 177 omitted, and in the second one primary antibody was pre-absorbed with a specific  
 178 synthetic peptide (c-Fos: sc-52P, ER $\alpha$ : sc-542P, ER $\beta$ : sc-6821P, Santa Cruz  
 179 Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA). After washing with PBS, sections were incubated for  
 180 2 hours at room temperature with biotin-conjugated goat anti-rabbit IgG (c-Fos and ER $\alpha$ )  
 181 or donkey anti-goat IgG (ER $\beta$ ) (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA) at a 1:100  
 182 dilution. Sections were washed with PBS to remove unbound secondary antibody and  
 183 incubated for 1 hour at room temperature in peroxidase-conjugated avidin-biotin reagent  
 184 (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA). Slides were washed with PBS,  
 185 developed with DAB substrate, and counterstained with Mayer's Hematoxylin. The number  
 186 of immunopositive nuclei and the staining intensity in the GE and LE were determined  
 187 using the Metamorph Imaging System. All the nuclei from the LE and GE were analyzed in  
 188 each section. Three sections by animal were analyzed. n = 5 animals per day. The  
 189 staining intensity of cell nuclei was assigned the following scores: (0) absent; (1) weak; (2)  
 190 moderate; and (3) intense. The histologic score (HSCORE) was calculated as follows:  
 191  $HSCORE = \sum P_i (i+1)$ , where i = 1, 2 or 3, and P<sub>i</sub> is the percentage of each intensity, from  
 192 0-100% (Lessey et al., 1988)

### Radioimmunoassay

193  
 194  
 195 Specific radioimmunoassay was performed in serum samples from all animals  
 196 studied during different days of the estrous cycle. All samples were stored at -70°C until  
 197 estradiol and progesterone were determined as previously described (Abraham, 1975).  
 198 The sensitivity of the assays was 5.43 pg/ml for E<sub>2</sub>, 8.3 ng/ml for P<sub>4</sub>. The intra and  
 199 interassay coefficients of variation were 5.3  $\pm$  8%, 6.5  $\pm$  10% respectively.

### Statistical Analysis

200  
 201  
 202 Immunohistochemistry, in situ hybridization, BrdU immunostaining and  
 203 radioimmunoassay data were analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA)  
 204 followed by a Tukey's multiple comparison test. The Prism 2.01 program (Graph Pad, San  
 205 Diego, CA) was used for calculating probability values and correlation coefficient.

## RESULTS

### Proliferation pattern in LE and GE of the rat uterus during the estrous cycle

206  
 207  
 208  
 209 In the LE proliferation was observed during M, D and P days (M: 35.6  $\pm$  5.5%, D:  
 210 47.0  $\pm$  3.29% and P: 30.5  $\pm$  7.83%). In contrast the GE presented proliferation during M  
 211 and D days (55.33  $\pm$  2.33%, 58.0  $\pm$  2.12% respectively). Whereas on E day, proliferation  
 212 was only detected in stroma (Figs. 1 and 2)  
 213

214  
215  
216  
217  
218  
219  
220  
221  
222  
223  
224  
225  
226  
227  
228  
229  
230  
231  
232  
233  
234  
235  
236  
237  
238  
239  
240  
241  
242  
243  
244  
245  
246  
247  
248  
249  
250  
251  
252  
253  
254  
255  
256

### **Immunodetection of ER $\alpha$ and ER $\beta$ in the rat uterus during the estrous cycle**

ER $\alpha$  was the predominant isoform in the uterus. In both luminal and glandular epithelium the highest number of ER $\alpha$  immunopositive nuclei were observed during the metestrus and the diestrus days (median HScore: LE: M = 228.9  $\pm$  39.9 and D = 152  $\pm$  17.9) (GE: M = 295  $\pm$  27 and D = 336  $\pm$  6.1) (Figs. 3 A-D and 4), as compared with the proestrus (median HScore: LE = 81.6  $\pm$  4.7 %, GE = 111.2  $\pm$  16.4) and the estrus days (median HScore: LE = 114.4  $\pm$  8.1 %, GE = 122.6  $\pm$  11.6). (Figs 3 E-G and 4). On proestrus and estrus days cytoplasmic localization of ER $\alpha$  was observed. The presence of ER $\alpha$  was observed in stromal cell nuclei during all stages of the cycle. In contrast estrogen receptor  $\beta$  was undetectable in both epithelia during all stages of the cycle. However ER $\beta$  was detected in stroma both in nuclear and cytoplasmic localization, mainly in the latter, and the highest immunostaining was detected on metestrus and diestrus days. Figure 3I shows ER $\beta$  expression on the metestrus day. ER $\beta$  was detected in ovaries as control expression tissue for this isoform. In this tissue ER $\beta$  was localized in the nuclei (Fig. 3J).

### **c-fos mRNA expression detected by in situ hybridization in the rat uterus during the estrous cycle**

c-fos mRNA expression was detected by specific in situ hybridization. The results demonstrated that in all uterine tissues the higher content of c-fos mRNA was during the metestrus day. In the epithelia, it was detected in both LE (62.87  $\pm$  8.07 mean grey value) and GE (71.97  $\pm$  5.34 mean grey value). c-fos expression was markedly detected also in the periluminal stroma and in the myometrium (Figs 5 and 6). A marked reduction in c-fos gene expression was detected from the diestrus to the estrus day (E: LE 15.62  $\pm$  2.97 and GE 21.9  $\pm$  1.75 mean grey value).

### **Immunodetection of c-Fos protein in the rat uterus during estrous cycle**

Fos protein was assessed by immunohistochemistry in serial sections of the uterus. The Fos immunopositive nuclei were observed on the metestrus (median HScore: LE = 183  $\pm$  10.7, GE = 187  $\pm$  37), diestrus (median HScore: LE = 211.3  $\pm$  28.9, GE = 268.3  $\pm$  31.8) and proestrus (median HScore: LE = 145.9  $\pm$  10.7, GE = 114.7  $\pm$  25.0) days in epithelium and stroma. The lowest number of Fos immunopositive nuclei in epithelial cells were detected on estrus day (median HScore: LE = 72.4  $\pm$  7.1, GE = 56.2  $\pm$  20.0) and remained in some stromal cells during this day of the cycle (Figs 7 and 8). The increase observed in c-Fos protein in the LE presented a high correlation ( $r = 0.9877$ ,  $p = 0.012$ ) with the cellular proliferation pattern of this cellular type. A similar tendency was observed between c-Fos and proliferation in the GE, however the correlation was not significant.

### **Radioimmunoassay**

Estradiol and progesterone plasma levels were determined in all studied animals. The highest estradiol and progesterone levels were found on the proestrus day (table 1).

## DISCUSSION

256  
257 It has been demonstrated in the uteri of adult ovariectomized rats that estradiol  
258 induces proliferation of luminal and glandular epithelium through the early induction of  
259 transcription factors including several proto-oncogenes (Weisz et al., 1988; Loose-Mitchell  
260 et al., 1988; Nephew et al., 1995; Bigsby and Li, 1994; Weisz et al., 1990; Nephew et al.,  
261 1993; Webb et al., 1993; Travers and Knowler 1987; Murphy et al., 1987) *c-fos* gene  
262 induction by 17 $\beta$ -estradiol in the uterus of ovariectomized rats has been widely  
263 demonstrated by Northern blot (Weisz and Bresciani, 1988, Loose-Mitchell et al., 1988;  
264 Bigsby and Li, 1994), immunohistochemistry (Papa et al., 1991), and in situ hybridization  
265 (Nephew et al., 1995) Indeed, we also observed by in situ hybridization and  
266 immunohistochemistry that *c-fos* mRNA and protein are induced in the LE and GE of the  
267 uterus of ovariectomized E<sub>2</sub> treated animals (data not shown).

268 However, all these experiments have been done in pharmacological conditions and  
269 have the difficulty to establish similar physiological conditions to that of the estrous cycle. It  
270 has been established in different studies in rodents, that ovariectomized animals respond  
271 in a different manner to steroid hormones than the intact animals (Molnar and Murphy,  
272 1994; Nandha et al., 1999; Cameron et al., 2002) Indeed, during the rats' estrous cycle all  
273 the hormonal, uterine and ovarian factors may play a role in proliferation and regression of  
274 the uterine epithelium. These results prompted us to evaluate *c-fos* gene expression under  
275 physiological conditions, such as the natural estrous cycle in which marked and cyclic  
276 changes in proliferation are observed.

277 As figures 1 and 2 show, maximal levels of luminal and glandular epithelia  
278 proliferation occur during metestrus and diestrus days. Labeling index and mitotic rate of  
279 the luminal and glandular epithelia during the estrous cycle have been reported by several  
280 authors (Bertalanffy and Lau, 1963; Leroy et al., 1969; Marcus, 1974; Burroughs et al.,  
281 2000) Our results are in agreement with these authors who reported luminal epithelium  
282 proliferation during the metestrus and the diestrus days. However, in the glandular  
283 epithelium our results of proliferation are in agreement with the data of Bertalanffy and  
284 Lau, and Leroy et al., but in discrepancy with the data of Marcus, and Burroughs et al.,  
285 who reported proliferation of this cellular type only during the metestrus day. These  
286 differences could be due to the time of day at which the tissues were harvested, since  
287 blood concentrations of estradiol vary according to the time of the day within a given day  
288 of the cycle.

289 In ovariectomized rats, E<sub>2</sub> treatment induced proliferation of LE 24 h after its  
290 administration, and returned to basal levels 36 h after E<sub>2</sub> administration (Tachi et al.,  
291 1972) In this study, in intact animals, we observed a sustained proliferation during  
292 metestrus and diestrus days (Figs 1 and 2), even though E<sub>2</sub> levels are low (Table 1),  
293 indicating that low levels of estradiol are sufficient to induce proliferation, and this  
294 sustained effect of estradiol does not occur in LE of ovariectomized animals. In addition,  
295 during proestrus, when the levels of E<sub>2</sub> are highest, luminal epithelia presented  
296 proliferation, but not 24 h after, during the estrus day when epithelial cell death is observed  
297 (Mendoza-Rodríguez et al., 2002). In GE a sustained effect of estradiol action is observed  
298 in ovariectomized rats. E<sub>2</sub> induced proliferation of this cellular type, which starts 12 h after  
299 its administration, presents a peak at 48 h and returning to basal levels by 72 h after E<sub>2</sub>  
300 treatment (Tachi et al., 1972) During the estrous cycle, maximal proliferation is observed  
301 in metestrus day, which occurs 48 h after the highest estradiol level observed in proestrus  
302 day (Table 1). However, during diestrus day (72 h after the estradiol peak) we still observe

303 proliferation of this cellular type. These results indicate that in addition to estradiol, there  
304 are other factors that regulate proliferation in this tissue during the estrous cycle.

305 In several mammals including rodents, cyclical hormone levels regulate ER $\alpha$   
306 activity in uterus and oviduct. Both up- and down regulation of ER $\alpha$  mRNA and protein  
307 levels by E<sub>2</sub> have been demonstrated. Down regulation of ER $\alpha$  mRNA and protein in  
308 uterine epithelial cells of ovariectomized adult female rats treated with E<sub>2</sub> occurs 6 hours  
309 after hormone administration (Nephew et al., 2000). Up regulation of ER $\alpha$  mRNA and  
310 protein was observed 24 hours after treatment and returned to baseline by 72 hours. It has  
311 been reported that progesterone reduces ER $\alpha$  expression in luminal epithelium of  
312 ovariectomized rats primed with E<sub>2</sub>. In line with these observations, we detected the lowest  
313 ER $\alpha$  expression during the proestrus and the estrus days when estradiol and  
314 progesterone levels are increased respectively (Table 1).

315 It has been reported that ER $\alpha$  is the dominant subtype in the luminal and glandular  
316 epithelium of the rat uterus (Wang et al., 1999). Accordingly, we found that ER $\beta$  was  
317 undetectable in both epithelia during all stages of the cycle. However, ER $\beta$  was detected in  
318 the stroma both in nuclei and cytoplasmic localization, mainly in the latter, and the highest  
319 immunostaining was detected on the metestrus and the diestrus days (Fig 3). These  
320 results support the view that ER $\alpha$  and ER $\beta$  mediate distinct pathways of estrogen action in  
321 the epithelia and stroma of rat uterus during the estrous cycle. In glandular epithelium the  
322 high ER $\alpha$  expression in metestrus and diestrus days presented a significant correlation  
323 with GE proliferation. The same tendency was observed in LE, however, a non significant  
324 correlation was observed.

325 It is well known that the hormone-receptor complex initiates uterine responses by  
326 interacting with estrogen response elements of early target genes whose protein products  
327 are thought to amplify the signal emanating from the initial hormone-receptor interaction.  
328 Some of the best studied examples of such target genes are the members of the AP-1  
329 family of transcription factors. Indeed, in ovariectomized rats *c-fos* gene expression is  
330 induced early by E<sub>2</sub> in uterine luminal and glandular epithelium. In these and other well  
331 studied models, *c-fos* gene expression is regulated at the transcriptional level and presents  
332 a short half life. In the present study the major *c-fos* mRNA expression level was observed  
333 during metestrus day followed by a significant reduction the following days of the cycle. In  
334 intact animals during the estrous cycle, we did not find a strict correlation between *c-fos*  
335 mRNA and ER $\alpha$  protein content (figs 4 and 6). On line with this observation, in  
336 ovariectomized animals it has been observed that *c-fos* mRNA is induced 2-3 h after E<sub>2</sub>  
337 administration (Papa et al., 1991; Nephew et al., 1995), while ER $\alpha$  protein is inhibited 3 to  
338 6 hours after E<sub>2</sub> administration (Nephew et al., 2000) followed by an increase 24 hours  
339 after hormone administration. It is known that the promoter of *c-fos* contains ERE. In  
340 metestrus day, the increase observed in ER $\alpha$  may directly stimulate *c-fos* mRNA  
341 expression. However, in diestrus day we still observed high levels of ER $\alpha$ , but low levels of  
342 *c-fos* mRNA. This may be due to a change in the balance of E<sub>2</sub>/P<sub>4</sub>, in which P<sub>4</sub> may play an  
343 inhibitory role (Bigsby and Li, 1994), or due to the *c-fos* promoter responds to other stimuli  
344 (Karin et al., 1997). The regulation of *c-fos* expression in intact animals does not appear to  
345 be related only with estrogen systemic levels but with a complex network including a  
346 variety of growth and differentiation-promoting stimuli, which deserves to be investigated.

347 In the present study the major *c-fos* mRNA expression level was observed during  
348 metestrus day followed by a significant reduction the following days of the cycle, whereas



349 an increased level of the c-Fos protein was observed during M and D days, thus indicating  
350 that a postranscriptional regulation of c-Fos occurs. Postranscriptional regulation of *c-fos*  
351 gene has been detected in the uterine epithelial cells of the ewe during estrous cycle  
352 (Johnson et al., 1997). In other biological models such as mouse liver regeneration the  
353 steady-state levels of *c-fos* transcripts increased to high levels after hepatectomy and were  
354 maintained for several hours due to post-transcriptional control mechanisms (Sobczak et  
355 al., 1989). Transient induction of *c-fos* mRNA and protein in human fibroblasts suggest  
356 that regulation occurs not only by transcriptional activation but also at the level of turnover  
357 of the gene product (Rahmsdorf et al., 1987).

358 Our results showed that the c-Fos maximal protein level in uterine luminal and  
359 glandular epithelium of intact animals was on the metestrus and the diestrus days, when  
360 the highest proliferation rate was observed in these cell types (Figs. 2 and 8). However, in  
361 proestrus day, we observed minimal GE proliferation although c-Fos protein expression  
362 was still observed, even though it presented a markedly lower content than in M and D  
363 days (Fig. 8). These results indicated that c-Fos protein presented a good correlation with  
364 uterine epithelial cell proliferation of LE, and the same tendency was observed in GE,  
365 although no significant correlation was observed. Whether c-Fos is regulated in this  
366 cellular type by other transcription factors involved in other uterine functions, apart from  
367 proliferation deserves further investigation.

368 It has been reported that cyclins D1 and D3 are up-regulated by estrogens in  
369 epithelial cells of the endometrium (Zhuang et al., 2001). Fos, directly or indirectly,  
370 regulates the transcription of cyclin D1 gene and may function as a critical link between  
371 estradiol stimulation and cell proliferation (Brown et al., 1998). In ovariectomized rats,  
372 estradiol treatment induces differential cyclin D1 and D3 gene expression in the LE and  
373 GE respectively, thus indicating that cell type-specific up-regulation of these proteins occur  
374 in these different cellular types. These results are in line with the differential c-Fos  
375 proliferation function observed between LE and GE in our study (figs. 7 and 8).

376 In conclusion, Fos protein in uterine epithelial cells varies throughout the  
377 estrous cycle and presents its maximal content when these cellular types present maximal  
378 proliferation, indicating that Fos protein is involved in the regulation of the proliferation of  
379 these cellular types during the estrous cycle. However, *c-fos* mRNA does not correlate  
380 strictly either with its protein induction or with ER $\alpha$  protein. In addition, c-Fos seems to  
381 have a postranscriptional regulation in uterine epithelial cells during the rat's estrous cycle.

382  
383

#### 384 ACKNOWLEDGEMENTS

385 This study was supported in part by a CONACyT Grant no. 34861-N and Faculty of  
386 Chemistry UNAM Mexico. CA Mendoza-Rodríguez is a CONACyT Fellow. We thank Dr. T  
387 Curran for his kind gift of the *c-fos* vectors used in cRNAs synthesis used in "in situ  
388 hybridization", and Dr. J Limón-Lason for the English revision of the manuscript.

389

## REFERENCES

- 389  
390 Abraham GE. 1975 Radioimmunoassays of steroids in biological fluids J Steroid Biochem  
391 6: 261-270.
- 392 Bertalanffy FD, Lau C. 1963. Mitotic rates, renewal times, and cytodynamics of the female  
393 genital tract epithelia in the rat. Acta Anat 54: 39-81
- 394 Brown JR, Nigh E, Lee RJ, Ye H, Thompson MA, Saudou F, Pestell RG, Greenberg ME.  
395 1998 Fos family members induce cell cycle entry by activating cyclin D1 Mol Cell Biol  
396 18: 5609-5619.
- 397 Bigsby RM, Li A. 1994 Differentially regulated immediate early genes in the rat uterus  
398 Endocrinology 134: 1820-1826
- 399 Cameron VA, Autelitano DJ, Evans JJ, Ellmers LJ, Espiner EA, Nicholls MG, Richards AM.  
400 2002. Adrenomedullin expression in rat uterus is correlated with plasma estradiol. Am J  
401 Physiol Endocrinol Metab 282: E139-E146.
- 402 Clark BF. 1971 The effects of oestrogen and progesterone on uterine cell division and  
403 epithelial morphology in spayed, adrenalectomized rats J Endocrinol 50: 527-528
- 404 Curran T, Gordon MB, Rubino KL, Sambucetti LC. 1987 Isolation and characterization of  
405 the *c-fos* (rat) cDNA and analysis of post-translational modification *in vitro* Oncogene 2:  
406 79-84.
- 407 DiAugustine RP, Petrusz P, Bell GI, Brown CF, Korach KS, McLachlan JA, Teng CT.  
408 1988. Influence of estrogens on mouse uterine epidermal growth factor precursor  
409 protein and messenger ribonucleic acid. Endocrinology 122: 2355-2363
- 410 Huet-Hudson YM, Chakraborty C, De SK, Suzuki Y, Andrews GK, Dey SK. 1990 Estrogen  
411 regulates the synthesis of epidermal growth factor in mouse uterine epithelial cells Mol  
412 Endocrinol 4: 510-523
- 413 Hyder SM, Cram LF, Loose-Mitchell DS. 1991a Sequence of a 1.4-kb region in the 3'-  
414 flanking region of the murine *c-fos* proto-oncogene which contains an estrogen-  
415 response element Gene 105: 281-282
- 416 Hyder SM, Stancel GM, Loose-Mitchell DS. 1991b Presence of an estradiol response  
417 region in the mouse *c-fos* oncogene. Steroids 56: 498-504.
- 418 Johnson ML, Redmer DA, Reynolds LP. 1997. Uterine growth, cell proliferation, and *c-fos*  
419 proto-oncogene expression throughout the oestrous cycle in ewe Biol Rep 56: 393-401
- 420 Karin M, Liu Z, Zandi E. 1997 AP-1 function and regulation. Curr Opin Cell Biol 9: 240-  
421 246.
- 422 Kaye AM, Sheratzky D, Linder HR. 1972 Kinetics of DNA synthesis in immature rat  
423 uterus: age dependence and estradiol stimulation. Biochim Biophys Acta 261: 475-486
- 424 Kraus WL, Katzenellenbogen BS. 1993 Regulation of progesterone receptor gene  
425 expression and growth in the rat uterus: modulation of estrogen actions by  
426 progesterone and sex steroid hormone antagonists Endocrinology 132: 2371-2379
- 427 Leroy F, Galand P, Chrétien J. 1969. The mitogenic action of ovarian hormones on the  
428 uterine and the vaginal epithelium during the oestrous cycle in the rat: a  
429 radioautographic study J Endocrinol 45: 441-447
- 430 Lessey BA, Killam AP, Metzger DA, Haney AF, Greene GL, McCarty KS Jr. 1988  
431 Immunohistochemical analysis of the human uterine estrogen and progesterone  
432 receptors throughout the menstrual cycle J Clin Endocrinol Metab 67: 334-340
- 433 Lingham RB, Stancel GM, Loose-Mitchell DS. 1988. Estrogen regulation of epidermal  
434 growth factor receptor messenger ribonucleic acid Mol Endocrinol 2: 230-235

- 435 Loose-Mitchell DS, Chiappetta C, Stancel GM 1988 Estrogen regulation of *c-fos*  
436 messenger ribonucleic acid Mol Endocrinol 2: 946-951.
- 437 Marcus GJ. 1974. Mitosis in the rat uterus during the estrous cycle, early pregnancy, and  
438 early pseudopregnancy. Biol Reprod 10: 447-452
- 439 McKenna NJ, Lanz RB, O'Malley BW. 1999. Nuclear receptor coregulators: cellular and  
440 molecular biology. Endocr Rev 20: 321-344.
- 441 Mendoza-Rodríguez CA, Camacho-Arroyo I, García GA, Cerbón MA. 1999 Variations of  
442 progesterone receptor and *c-fos* gene expression in the rat uterus after treatment with  
443 norethisterone and its A-ring reduced metabolites Contraception 59: 339-343.
- 444 Mendoza-Rodríguez CA, Merchant-Larios H, Segura-Valdez ML, Moreno-Mendoza N,  
445 Cruz ME, Arteaga-Lopez P, Camacho-Arroyo I, Domínguez R, Cerbón M 2002  
446 Expressio of p53 in luminal and glandular epithelium during the growth and regression  
447 of rat uterus during the estrous cycle Mol Reprod Dev 61: 445-452.
- 448 Molnar P, Murphy LJ. 1994 Effects of oestrogen on rat uterine expression of insulin-like  
449 growth factor-binding proteins. J Mol Endocrinol 13: 59-67.
- 450 Murphy LJ, Ghahary A 1990 Uterine insulin-like growth factor-1: regulation of expression  
451 and its role in estrogen-induced uterine proliferation Endocr Rev 11: 443-453
- 452 Murphy LJ, Murphy LC, Friesen HG. 1987 Estrogen induction of *N-myc* and *c-myc* proto-  
453 oncogene expression in the rat uterus. Endocrinology 120: 1882-1888.
- 454 Nandha KA, Benito-Orfila MA, Jamal H, Akinsanya KO, Bloom SR, Smith DM. 1999.  
455 Effect of steroids and the estrous cycle on uterine neuromedin U receptor expression.  
456 Peptides 20: 1203-1209
- 457 Nephew KP, Peters GA, Khan SA 1995 Cellular localization of estradiol induced *c-fos*  
458 messenger ribonucleic acid in the rat uterus: *c-fos* expression and uterine cell  
459 proliferation do not correlate strictly Endocrinology 136: 3007-3015
- 460 Nephew KP, Webb DK, Akcali KC, Moulton BC, Khan SA 1993. Hormonal regulation and  
461 expression of the *jun-D* protooncogene in specific cell types of the rat uterus J Steroid  
462 Biochem Mol Biol 46: 281-287
- 463 Nephew KP, Long X, Osborne E, Burke KE, Ahluwalia A, Bigsby RM. 2000 Effect of  
464 estradiol on estrogen receptor expression in rat uterine cell types Biol Reprod 62: 168-  
465 177
- 466 Papa M, Mezzogiorno V, Bresciani F, Weisz A 1991. Estrogen induces *c-fos* expression  
467 specifically in the luminal and glandular epithelia of adult rat uterus. Biochem Biophys  
468 Res Commun 175: 480-485
- 469 Rahmsdorf HJ, Shonthal A, Angel P, Litfin M, Ruther H, Herrlich P. 1987  
470 Posttranscriptional regulation of *c-fos* mRNA expression Nucleic Acids Res 25: 1643-  
471 1659
- 472 Savouret JF, Rauch M, Redeuilh G, Sar S, Chauchereau A, Woodruff K, Parker MG,  
473 Milgrom E 1994 Interplay between estrogens, progestins, retinoic acid and AP-1 on a  
474 single regulatory site in the progesterone receptor gene. J Biol Chem 269: 28955-  
475 28962
- 476 Sobczak J, Mechti N, Tournier MF, Blanchard JM, Duguet M 1989 *c-myc* and *c-fos* gene  
477 regulation during mouse liver regeneration Oncogene 4: 1503-1508.
- 478 Tachi C, Tachi S, Lindner HR. 1972. Modification by progesterone of oestradiol-induced  
479 cell proliferation, RNA synthesis and oestradiol distribution in the rat uterus J Reprod  
480 Fert 31: 59-76

- 481 Travers MT, Knowler JT. 1987. Oestrogen-induced expression of oncogenes in the  
482 immature rat uterus FEBS Lett 211: 27-30.
- 483 Wang H, Masironi B, Eriksson H, Sahlin L. 1999. A comparative study of estrogen  
484 receptors  $\alpha$  and  $\beta$  in the rat uterus. Biol Reprod 61: 955-964
- 485 Webb DK, Moulton BC, Khan SA. 1993. Estrogen induces expression of *c-jun* and *jun-B*  
486 protooncogenes in specific rat uterine cells. Endocrinology 133: 20-28.
- 487 Weisz A, Bresciani F. 1988. Estrogen induces expression of *c-fos* and *c-myc*  
488 protooncogenes in rat uterus. Mol Endocrinol 2: 816-824.
- 489 Weisz A, Cicatiello L, Persico E, Scalona M, Bresciani F. 1990. Estrogen stimulates  
490 transcription of *c-jun* protooncogene. Mol Endocrinol 4: 1041-1050.
- 491 Weisz A, Rosales R. 1990. Identification of an estrogen response element upstream of the  
492 human *c-fos* gene that binds the estrogen receptor and the AP-1 transcription factor  
493 Nucleic Acids Res 18: 5097-5106
- 494 Zhuang YH, Sarca D, Weisz A, Altucci L, Cicatiello L, Rollerova E, Tuohimaa P, Ylikomi T  
495 2001. Cell type-specific induction of cyclin D and cyclin-dependent kinase inhibitor  
496 p27<sup>kip1</sup> expression by estrogen in rat endometrium. J Steroid Biochem Mol Biol 78: 193-  
497 199  
498

498 **Figure Legends**

499 **Figure 1** BrdU incorporation was used to determine the proliferation of uterine tissues of  
500 the rat at each stage of the estrous cycle. On metestrus (A) and diestrus (B) days luminal  
501 and glandular epithelium present proliferation. On proestrus day (C and E) proliferation is  
502 observed in luminal epithelium and stroma, whereas on estrus day (D and F) proliferation  
503 was only detected in stroma. In G) negative control is a serial section of tissue during  
504 proestrus day in which primary antibody was omitted). Bar = 100  $\mu\text{m}$  in A, B, C, D and G  
505 In E and F bar = 50  $\mu\text{m}$ . LE, luminal epithelium; GE, glandular epithelium; S, stroma  
506

507 **Figure 2** Quantitative representation of BrdU incorporation in the uterine epithelia during  
508 the estrous cycle. Immunofluorescent nuclei were determined in: A) luminal epithelium and  
509 B) glandular epithelium. M, metestrus; D, diestrus; P, proestrus; E, estrus. Results are  
510 expressed as the mean  $\pm$  SEM. In A)  $**p < 0.001$  as compared with D,  $p < 0.01$  as compared  
511 with M, and  $p < 0.05$  as compared with P. In B)  $**p < 0.001$  as compared with M and D.  
512

513 **Figure 3** Immunohistochemical localization of ER $\alpha$  protein in the rat uterus during the  
514 estrous cycle. A) and B) metestrus; C) and D) diestrus; E) and F) proestrus; G) estrus; H)  
515 negative control was a serial section of tissue in metestrus in which primary antibody was  
516 pre-absorbed with a specific synthetic peptide. A), C), E) and G) show luminal epithelium.  
517 B), D) and F) show glandular epithelium. Intense specific nuclear immunostaining was  
518 observed in the luminal and glandular epithelium during metestrus and diestrus and a  
519 decrease in number and intensity of immunostained nuclei was observed during proestrus  
520 and estrus days. In I) we show the immunohistochemical localization of ER $\beta$  protein in the  
521 rat uterus during the metestrus day. In J) a section of ovary tissue stained with ER $\beta$   
522 antibody as a positive control is shown. In K) ER $\beta$  negative control was a serial section of  
523 tissue in metestrus in which primary antibody was pre-absorbed with a specific synthetic  
524 peptide. Bar = 25  $\mu\text{m}$  in A-G. In H-J bar = 50  $\mu\text{m}$ . In K bar = 75  $\mu\text{m}$ .  
525

526 **Figure 4.** ER $\alpha$  protein expression level in luminal and glandular epithelium.  
527 Immunohistochemistry was performed in the uterus of 5 different animals in each day of  
528 the cycle to determine ER $\alpha$  protein content. The histologic score (HSCORE) was  
529 calculated, as described in Materials and Methods, in: A) luminal epithelium and B)  
530 glandular epithelium. M, metestrus; D, diestrus; P, proestrus; E, estrus. Results are  
531 expressed as the mean  $\pm$  SEM. In A)  $*p < 0.01$  as compared with M. In B)  $**p < 0.001$  as  
532 compared with M and D.  
533

534 **Figure 5.** Expression of *c-fos* mRNA in the rat uterus during the estrous cycle analyzed by  
535 in situ hybridization. A) metestrus; B) diestrus; C) proestrus; D) estrus; E) negative controls  
536 are serial sections of tissue in metestrus hybridized with the sense probe. Intense  
537 cytoplasmic staining was observed in the luminal and glandular epithelium on metestrus  
538 day and decreased on the following days. Bar = 100  $\mu\text{m}$ . LE, luminal epithelium; GE,  
539 glandular epithelium; S, stroma  
540

540 Figure 6 *c-fos* mRNA expression level in luminal and glandular epithelium. In situ  
 541 hybridization was performed in the uterus of 5 different animals in each day of the cycle to  
 542 determine *c-fos* mRNA content. Staining intensity (mean gray value) of immunopositive  
 543 cells was evaluated in: A) luminal epithelium and B) glandular epithelium. M, metestrus; D,  
 544 diestrus; P, proestrus; E, estrus. Results are expressed as the mean  $\pm$  SEM. In A) \*\* $p <$   
 545  $0.001$  as compared with D and E, and  $p < 0.01$  as compared with P. In B) \*\* $p <$   
 546  $0.001$  as compared with P and E, and  $p < 0.05$  as compared with D.

547  
 548 Figure 7 Immunohistochemical localization of c-Fos protein in the rat uterus during the  
 549 estrous cycle. A) and B) metestrus; C) and D) diestrus; E) and F) proestrus; G) and H)  
 550 estrus. A), C), E) and G) show luminal epithelium. B), D) and F) show glandular epithelium.  
 551 Intense specific nuclear immunostaining was observed in the luminal and glandular  
 552 epithelium during metestrus and diestrus and a decrease in number and intensity of  
 553 immunostained nuclei was observed during proestrus and estrus days. Bar = 25  $\mu\text{m}$  in A-  
 554 G. In H bar = 50  $\mu\text{m}$ .

555  
 556 Figure 8 c-Fos protein expression level in luminal and glandular epithelium.  
 557 Immunohistochemistry was performed in the uterus of 5 different animals in each day of  
 558 the cycle to determine c-Fos protein content. The histologic score (HSCORE) was  
 559 calculated, as described in Materials and Methods, in: A) luminal epithelium and B)  
 560 glandular epithelium. M, metestrus; D, diestrus; P, proestrus; E, estrus. Results are  
 561 expressed as the mean  $\pm$  SEM. In A) \*\* $p < 0.001$  as compared with D,  $p < 0.01$  as  
 562 compared with M, and  $p < 0.05$  as compared with P. In B) \*\* $p < 0.001$  as compared with D,  
 563 and  $p < 0.05$  as compared with M; and \* $p < 0.01$  as compared with D.

564

565

566 Table 1. Variations of estradiol and progesterone serum levels during the estrous cycle.

Day of the cycle	E <sub>2</sub> (pg/ml)	P <sub>4</sub> (ng/ml)
Metestrus	20.14 $\pm$ 4.56	14.11 $\pm$ 4.26
Diestrus	20.97 $\pm$ 2.81	8.39 $\pm$ 2.61
Proestrus	37.99 $\pm$ 6.63	20.94 $\pm$ 4.83
Estrus	15.92 $\pm$ 4.41	4.60 $\pm$ 0.90

567 Steroid levels were determined by radioimmunoassay. Data are expressed as the mean  $\pm$   
 568 SEM of five animals/ day of the cycle