



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**"Cambios en el contenido de SRC-1 y SMRT  
en el sistema nervioso central de la rata  
durante el ciclo estral."**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
B I Ó L O G A  
P R E S E N T A :  
TERESA NERI GÓMEZ



DIRECTOR DE TESIS: DR. IGNACIO CAMACHO ARROYO



FACULTAD DE CIENCIAS  
SECCION ESCOLAR



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.



GOBIERNO FEDERAL  
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN  
MEXICO

**ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ**  
**Jefe de la División de Estudios Profesionales de la**  
**Facultad de Ciencias**  
**Presente**

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:

"Cambios en el contenido de SRC-1 y SMRT en el sistema nervioso central de la rata durante el ciclo estral"

realizado por Teresa Neri Gómez

con número de cuenta 09627581-2 , quien cubrió los créditos de la carrera de: Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

A t e n t a m e n t e

Director de Tesis

Propietario Dr. Ignacio Camacho Arroyo

Propietario Dr. Christian Humberto Guerra Araiza

Propietario Dra. Aliesha Araceli González Arenas

Suplente Biol. Olga Villamar Cruz

Suplente M. en C. Gabriela González Agüero

*[Handwritten signatures of Ignacio Camacho Arroyo, Christian Humberto Guerra Araiza, Aliesha Araceli González Arenas, Olga Villamar Cruz, and Gabriela González Agüero]*

Consejo Departamental de Biología

*[Handwritten signature of Juan Manuel Rodríguez Chávez]*  
 M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chavez



FACULTAD DE CIENCIAS  
 UNIDAD DE ENSEÑANZA DE BIOLOGÍA

Este trabajo se realizó en el Departamento de Biología de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Ignacio Camacho Arroyo y con el apoyo del subprograma 127 "Formación Básica en Investigación" otorgado por la Facultad de Química.

## Dedicatorias y agradecimientos

A DIOS gracias por todo lo que me has dado.

A mi familia, mi papá (Gordon), mi mamá, mi hermano por soportarme tantos años, y darme su cariño a pesar de todo gracias.

A mis abuelos Amado, Herminda, Julia, Fernando y mis tios por esos ratos tan agradables.

A mis grandes amigos Arturo, Maribel (la socia), Jesús (chucho), Alicia, Judith, Alma, María Elena, Alex (Hunab), Alejandra, Nancy, Marlen, Fernando, gracias por su amistad y su compañía durante tanto tiempo.

A mis maestros en especial a Teresa Herrera, Alfredo Ayala, Fernando, Miguel Palomino, Herbert Vázquez, por sus grandiosas clases.

A todos muchas gracias.

## Agradecimientos

### **Al Dr. Ignacio Camacho Arroyo**

Por darme la oportunidad de participar en este proyecto y por el apoyo recibido durante el mismo, gracias.

### **A la Dra Aliesha González Arenas**

Por toda la paciencia que tuvo conmigo para enseñarme la realización de esta técnica, por esos ratos tan amenos, por su amistad, gracias.

### **Al Dr. Christian Guerra Araiza**

Por compartir su experiencia experimental, por su paciencia, por los ratos amenos en el laboratorio, por su amistad y confianza, gracias.

### **A la M. en C. (casi Dra) Gabriela González Agüero**

Por compartir sus experiencias experimentales y compartir ratos agradables en el laboratorio, gracias.

### **A la Dra. Andrea Reyna Neyra**

Por su paciencia y su ayuda para resolver algunas dudas, por su amistad y por dejarme ser tu hermanita, gracias.

### **A la Biol.(casi M en C) Olga Villamar Cruz**

Por tu gran amistad, por tu ayuda para este trabajo, por tus regaños de mamá por el desorden en el labo y por ser una de las tres chifladas, gracias.

### **A la Biol. exp. Edith Cabrera Muñoz**

Por tu apoyo incondicional, tu amistad, por tu confianza, por los ratos amenos que pasamos en el labo y tu ayuda en el trabajo diario muchas gracias.

A la Señora Genoveva que nos trae el periódico y nos hace pasar un rato ameno, al pequeño Iván por su apoyo y su amistad, a Emmanuelle por su amistad y apoyo, a toda la gente del laboratorio 202 por su apoyo, GRACIAS.

Cambios en el contenido de SRC-1 y SMRT en el sistema nervioso central de la rata durante el ciclo estral

ÍNDICE

1.	Resumen .....	1
2.	Introducción.....	2
3.	Antecedentes.....	3
3.1	Estructura y función de las hormonas esteroideas .....	3
3.2	Receptores a hormonas esteroideas.....	6
3.3	Cofactores.....	9
3.3.1	Generalidades .....	9
3.3.2	Coactivadores .....	10
3.3.2.1	Coactivador de receptores a hormonas esteroideas ( SRC ) .....	12
3.3.3	Correpresores.....	14
3.3.3.1	Silenciador mediador para el receptor a hormonas tiroideas y ácido retinoico (SMRT).....	15
3.4	Ciclos reproductivos.....	17
3.4.1	Generalidades .....	17
3.4.2	Ciclo estral de la rata .....	17
4.	Planteamiento del problema .....	19
5.	Hipótesis .....	20
6.	Objetivo General.....	20
7.	Materiales y métodos.....	20
7.1	Animales de experimentación .....	20
7.2	Caracterización del ciclo estral.....	20
7.3	Obtención de las diferentes regiones cerebrales .....	21
7.4	Extracción y cuantificación de proteínas totales .....	21
7.5	Western Blot.....	21
7.6	Radioinmunoanálisis .....	22
7.7	Análisis de resultados.....	22
8.	Resultados.....	23
9.	Discusión .....	28
10.	Conclusiones.....	31
11.	Referencias .....	32
12.	Apéndice.....	36

## 1. Resumen

Las hormonas esteroides participan en la regulación de diversos procesos fisiológicos en el cerebro de los mamíferos. Uno de los mecanismos por los cuales éstas ejercen sus efectos es a través de su interacción con receptores específicos que interactúan con cofactores capaces de aumentar su actividad transcripcional (coactivadores) o disminuirla (correpresores). Recientemente se han caracterizado varios coactivadores y correpresores, como el coactivador de receptores a esteroides (SRC-1) y el silenciador mediador para el receptor a hormonas tiroideas y ácido retinoico (SMRT). Se desconoce el contenido de estos cofactores en el sistema nervioso central de la rata durante el ciclo estral, en donde cambian de manera fisiológica los niveles de hormonas esteroides sexuales como el estradiol y la progesterona. En este trabajo se estudiaron los cambios en el contenido de SRC-1 y SMRT en el hipotálamo, el área preóptica y el hipocampo de la rata durante el ciclo estral, el cual consta de 4 etapas que se caracterizan citológicamente en: proestro, estro, metaestro y diestro. Las ratas se sacrificaron a las 12:00 en cada una de las etapas del ciclo estral y se disectaron las diferentes áreas del sistema nervioso central y mediante la técnica de Western Blot se detectaron los cofactores y la  $\beta$ -actina como control de carga. En el hipotálamo se observó un incremento significativo en el contenido de SRC-1 durante el proestro y el estro en relación con el diestro, mientras que en el caso de SMRT no se observaron cambios en su contenido durante el ciclo estral. En el área preóptica se observó un decremento significativo en el contenido de SMRT en el metaestro en comparación con los otros días del ciclo, mientras que en el caso de SRC-1 no se observaron cambios. En el hipocampo no hubo diferencias significativas en el contenido de SRC-1 y de SMRT a lo largo del ciclo estral. En el hipotálamo el cofactor predominante fue SRC-1 mientras que en el área preóptica el cofactor predominante fue SMRT a lo largo del ciclo estral. Nuestros datos muestran que el contenido del coactivador SRC-1 y del correpresor SMRT se modifica en el sistema nervioso central de la rata durante el ciclo estral de manera tejido-específica lo cual sugiere cambios en la actividad transcripcional de los receptores a hormonas esteroides particularmente de estradiol y progesterona en las diversas regiones cerebrales durante el ciclo estral de la rata.



## 2. Introducción

Las hormonas esteroides participan en la regulación de diversos procesos fisiológicos en el cerebro de los mamíferos, tales como la conducta sexual, la organización cerebral, la excitabilidad neuronal y la neuroprotección. Uno de los mecanismos por los cuales las hormonas esteroides ejercen sus efectos en el Sistema Nervioso Central es a través de su interacción con receptores específicos ya sea estimulando o inhibiendo la expresión de genes blanco. Las acciones de los receptores de las hormonas esteroides están mediadas en parte por cofactores capaces de aumentar la actividad transcripcional (coactivadores) o de disminuirla (correpresores).

Recientemente varios coactivadores y correpresores se han caracterizado, tal es el caso del coactivador de receptores a esteroides (SRC-1) y del silenciador mediador para el receptor a hormonas tiroideas y ácido retinoico (SMRT). Se desconocen los cambios en el contenido de estos cofactores durante el ciclo estral de la rata, que es un modelo fisiológico en el que cambian de manera cíclica los niveles de esteroides sexuales como el estradiol (E2), que en animales ovariectomizados aumenta la expresión de SRC-1 en el hipotálamo (Misiti et al., 1998). Por lo que en este trabajo se estudiaron los cambios en el contenido de SRC-1 y SMRT al nivel de la proteína en el hipotálamo, área preóptica e hipocampo de ratas hembras durante el ciclo estral.

### 3. Antecedentes

#### 3.1 Estructura y función de las hormonas esteroides

Las hormonas esteroides son lípidos no saponificables hidrofóbicos, solubles en disolventes orgánicos y cuya estructura consiste en un núcleo tetracíclico al cual se le denomina ciclo pentanoperhidrofenantreno debido a que presenta tres anillos de seis átomos de carbono (perhidrofenantreno) y un anillo de cinco átomos de carbono (ciclo pentano) (Knobil y Neil, 1988).

Las hormonas esteroides regulan múltiples procesos biológicos en los mamíferos, entre los que destacan la homeostasis hidroelectrolítica, las respuestas al estrés y la función reproductiva; además de regular distintas conductas. Todas las hormonas esteroides, con excepción del ácido retinoico, se derivan del colesterol, a partir del cual se forma la pregnenolona, que funciona como el principal intermediario para la síntesis de la mayoría de las hormonas esteroides. Los esteroides con 21 átomos de carbono se dividen en pregnanos, glucocorticoides y mineralocorticoides, mientras que los de 19 y 18 átomos se denominan androstanos y estranos respectivamente (Knobil y Neil, 1988; González-Arenas et al., 2001) (Fig. 1).

La corteza adrenal es la principal responsable de la producción de los glucocorticoides, que regulan el metabolismo de carbohidratos y las respuestas al estrés y los mineralocorticoides, que regulan los niveles de sodio y potasio. La progesterona ( $P_4$ ) y el  $E_2$  son producidos principalmente en el ovario, mientras que los andrógenos en su mayoría son sintetizados por los testículos. Estas hormonas regulan principalmente las funciones reproductivas de los mamíferos por lo que son conocidas como hormonas sexuales (González-Arenas et al., 2001) (Tabla 1).

Las hormonas esteroides tienen una velocidad de recambio elevada y no se almacenan, sino una vez que son secretadas pasan al torrente sanguíneo donde pueden circular libres o unidas a proteínas plasmáticas, tales como albúmina (cuando el enlace es inespecífico y poco afín) o las globulinas (cuando el enlace es de gran especificidad y de gran afinidad) (Wilson y Foster, 1992). El hígado es el órgano involucrado en el metabolismo de las hormonas esteroides (Greenspan y Strewler, 1998).

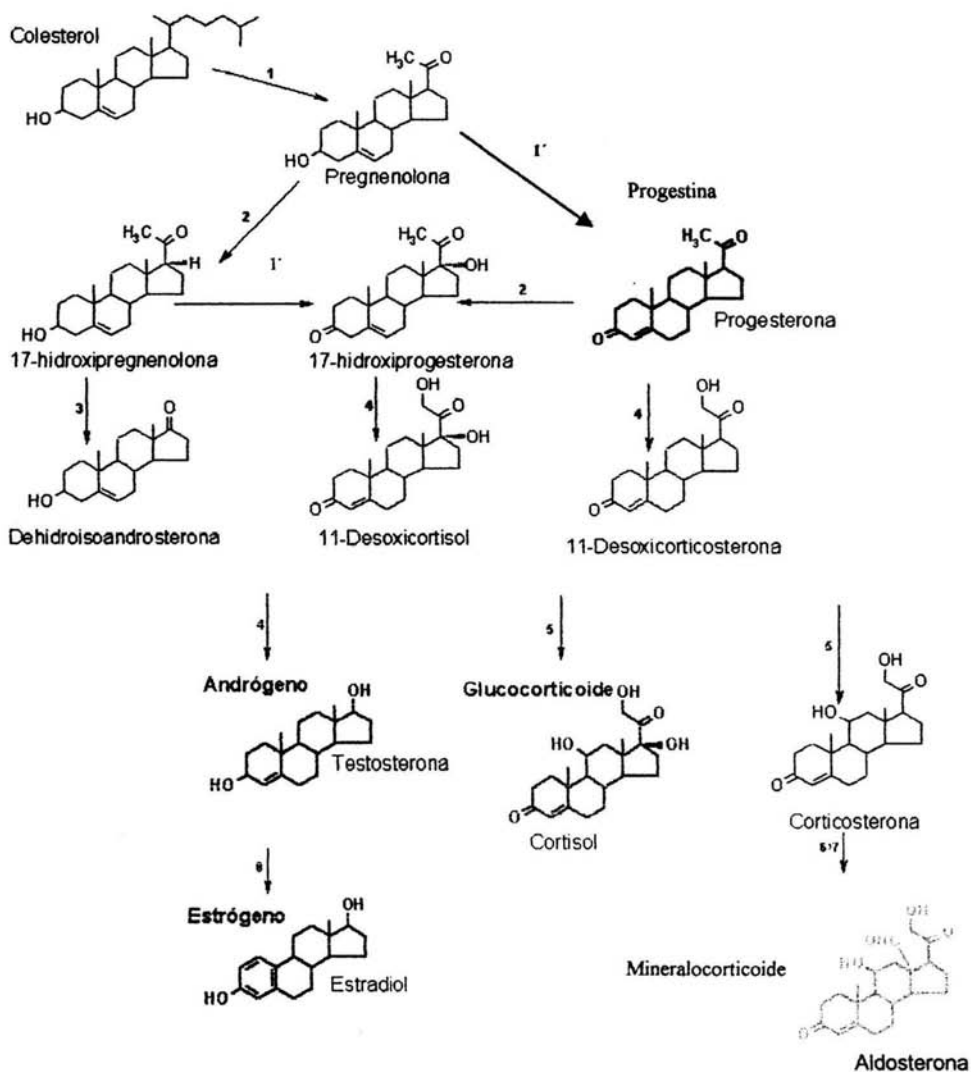


Fig. 1 Síntesis de las principales hormonas esteroides. 1) 20,22 desmolasa, 1') 3 $\beta$  -OH-esteroide deshidrogenasa 2) 17 $\alpha$ -hidroxilasa, 3) 17,20 liasa, 4) 21 hidroxilasa, 5) 11 $\beta$  hidroxilasa, 6) 18 hidroxilasa, 7) 18 hidroxiesteroide oxidasa, 8) aromatasas (Tomado de Eckert,1990).

Tabla 1. Función de las hormonas esteroides.

<i>Hormona</i>	<i>Lugar de síntesis</i>	<i>Función</i>
Progestinas (P <sub>4</sub> )	Ovario, Placenta y Sistema Nervioso Central	Preparación del endometrio para la implantación del óvulo fertilizado, mantenimiento del embarazo, desarrollo de la glándula mamaria, conducta sexual y excitabilidad neuronal.
Glucocorticoides (Cortisol)	Corteza adrenal	Regulación de las respuestas al estrés, modulación del metabolismo de glucosa y la gluconeogénesis.
Mineralocorticoides (Aldosterona)	Corteza adrenal	Metabolismo hidroelectrolítico. Retención de sodio y excreción de potasio.
Andrógenos (Testosterona)	Testículos	Conducta sexual y fenotipo masculino, espermatogénesis.
Estrógenos (E <sub>2</sub> )	Ovario, placenta	Diferenciación sexual del cerebro, conducta sexual femenina, maduración ósea.

Los efectos de las hormonas esteroides ocurren a corto, mediano y largo plazo debido a que éstas tienen diversos mecanismos de acción (Camacho-Arroyo et al., 1995). Las hormonas esteroides ejercen sus efectos a través de mecanismos genómicos y no genómicos. Los mecanismos genómicos involucra la unión de la hormona esteroide con su receptor intracelular específico para regular la transcripción de genes específicos. El mecanismo no genómico involucra la acción de las hormonas esteroides sobre las bicapas fosfolipídicas de la membrana celular, sistemas de segundos mensajeros, interacción con receptores membranales específicos e interacción con receptores a neurotransmisores como el del ácido  $\gamma$ -aminobutírico subtipo A (GABA<sub>A</sub>) (Prieto et al., 2003).

### 3.2 Receptores a hormonas esteroides

Los receptores a hormonas esteroides son proteínas nucleares que actúan como factores de transcripción inducidos por ligando que regulan específicamente la expresión de genes blanco involucrados en el metabolismo, desarrollo y reproducción. Estos receptores pertenecen a una familia de proteínas entre las que también se encuentran los receptores a vitamina D<sub>3</sub>, y las hormonas tiroideas y el ácido retinoico (9-cis y all-trans) (Burriss y McCabe, 2003).

Análisis filogenéticos han identificado varias subfamilias dentro de esta superfamilia como son: receptores de tipo I (clásicos o esteroides) que incluyen a los de P<sub>4</sub> (RP), a los de estrógenos (RE), a los de andrógenos (RA), a los de glucocorticoides (RG) y al de mineralocorticoides (RM). Estos receptores en ausencia de ligando se encuentran unidos a proteínas de choque térmico (HSP) y en este estado no inducen la transcripción de genes; los receptores de tipo II comprenden al receptor a hormonas tiroideas (RT), al de ácido retinoico all-trans (RAR), al de ácido retinoico 9-cis (RXR) y al de vitamina D<sub>3</sub> (VDR). Estos receptores son capaces de unirse al DNA en ausencia de ligando y pueden ejercer un efecto de represión en sus promotores, esto es conocido como silenciamiento. Una tercera subfamilia contiene a los receptores huérfanos, cuyos ligandos no se han caracterizado (McKenna et al., 1995).

Los receptores de tipo I se unen a secuencias palindrómicas repetidas solo en presencia del ligando, mientras que los receptores de tipo II se unen constitutivamente a elementos de respuesta que contienen repeticiones en tandem, además estos pueden formar heterodímeros como el RT con RXR. Estas interacciones pueden modular la respuesta transcripcional al ligando (McKenna et al., 1999; Burriss y McCabe, 2001).

Estos receptores contienen seis dominios: en el extremo N-terminal se encuentra el dominio A/B, la región de mayor variabilidad entre los diferentes receptores, tanto en secuencia como en longitud. El dominio A/B permite diferenciar entre isoformas del mismo receptor y tiene también la función de activación 1 (AF-1), que es una de las regiones con actividad transcripcional del receptor. En la región C se encuentra el dominio de unión al DNA (DBD), el cual es altamente conservado y está constituido por dos dedos de zinc. El dominio D presenta una secuencia variable conocida como bisagra y contiene una señal de localización nuclear. El dominio E está localizado hacia el extremo carboxilo terminal de la

región D; es relativamente largo y funcionalmente diverso ya que participa en: la unión con el ligando, con proteínas de choque térmico, la dimerización y la interacción con los cofactores. Esta región contiene también una señal de localización nuclear y la función de activación 2 (AF-2) que juega un papel importante en la regulación de la transcripción (Tata, 2002; Prieto et al., 2003). En cuanto al dominio F, existen estudios que muestran que participa en la función transcripcional del receptor y en su unión con agonistas y antagonistas (Schwartz et al., 2002) (Figura 2).

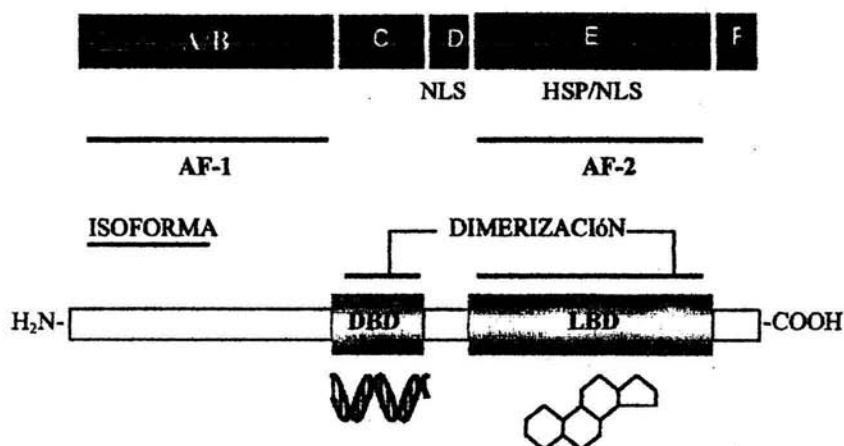


Fig. 2. Dominios funcionales de los receptores a hormonas esteroides. A-E dominios funcionales de los receptores a hormonas esteroides. AF: función de activación, DBD: dominio de unión al DNA, LBD: dominio de unión al ligando (Tomado de Prieto et al., 2003).

Las hormonas esteroides atraviesan las membranas celulares por difusión simple y en el núcleo se unen a sus respectivos receptores que se encuentran principalmente asociados con proteínas de choque térmico (HSP70, HSP90 y HSP56).

La unión con el ligando provoca un cambio estructural en el receptor que le permite la disociación de las HSPs y que activa al receptor exponiendo la región que le permite dimerizarse, resultando en una estructura con alta afinidad por secuencias específicas en el DNA llamadas elementos de respuesta hormonal (HRE); éstos son secuencias

palindrómicas separadas por tres nucleótidos en donde dos receptores se unen simétricamente a cada mitad de la secuencia como un homodímero cooperativo. Una vez unido al HRE, el complejo ligando-receptor facilita el ensamblaje y la estabilización del complejo de pre-iniciación de la transcripción en los promotores de genes regulados por hormonas esteroides, favoreciendo así la transcripción de genes blanco. Estos receptores interactúan con cofactores que: 1) pueden aumentar o disminuir la transcripción y 2) unir al receptor con los factores generales de transcripción y la RNA polimerasa II (Prieto et al., 2003; Burris y McCabe, 2001) (Fig. 3).

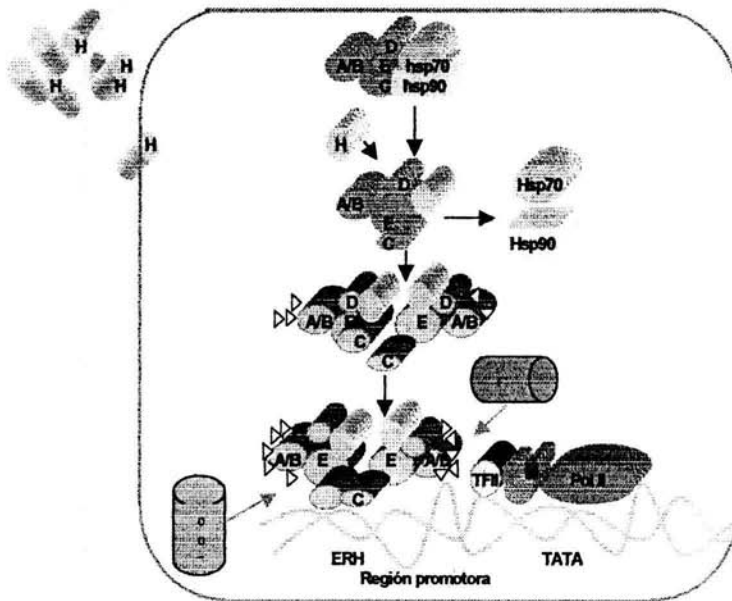


Fig 3. Mecanismo de acción genómico de las hormonas esteroides. El receptor a hormonas esteroides (A/B, C, D, E) se encuentra en un estado de inactivación, unido a proteínas de choque térmico (Hsp). La hormona (H) atraviesa la membrana plasmática y la envoltura nuclear e interactúa con su receptor, se liberan las Hsp, el receptor se dimeriza, se fosforila, se une a elementos de respuesta hormonal (ERH) y recluta a cofactores y a la maquinaria basal de transcripción.

### 3.3 Cofactores

#### 3.3.1 Generalidades

Los efectos biológicos de las hormonas esteroides a través de sus receptores requiere además de la maquinaria basal de la transcripción de otras proteínas llamadas cofactores o coreguladores (Tetel, 2000; Misiti et al., 1998).

Los coactivadores de los receptores a hormonas esteroides son proteínas que interactúan con los receptores nucleares unidos a su ligando y aumentan su actividad transcripcional. La evidencia inicial de la existencia de los coactivadores de los receptores a hormonas esteroides surgió de una observación de una interferencia transcripcional entre diferentes receptores. Se ha demostrado que la sobreexpresión de un receptor puede inhibir la actividad de otro receptor sin una interacción directa o que se sobrelape entre el DNA y el otro receptor sugiriendo que la función transcripcional puede ser mediada limitando la disponibilidad de factores celulares (Lee et al., 1995). Experimentos in vitro revelan que estos cofactores intervienen en la unión de los receptores con la maquinaria de transcripción basal y modifican la estructura de la cromatina regulando así la actividad transcripcional (Tetel 2002, Collingwood et al., 1999).

Usando el dominio de unión al ligando del receptor a estrógenos se identificaron dos proteínas que interactúan con este receptor en presencia de ligando: ERAP 140 y 160 del inglés "Estrogen Receptor Associate Protein", sugiriendo que este receptor interactúa con complejos específicos de proteínas.

Los coactivadores tienen la capacidad de: 1) interactuar con los receptores a hormonas esteroides en presencia del ligando, 2) aumentar la transcripción dependiente de ligando y 3) estimular la expresión génica actuando como puente entre el receptor activado y los factores de transcripción, o como enzimas que pueden remodelar la cromatina (Borris y McCabe, 2001).

Los correpresores disminuyen la actividad transcripcional de los receptores a hormonas esteroides. La existencia de los correpresores específicos de receptores a hormonas esteroides surgió de una observación en ensayos de cotransfecciones en donde la



actividad del RT era reducida por la parte carboxilo terminal de *v-erbA* o de la parte de unión a ligando del RT sin ligando, sugiriendo la existencia de correpresores para el receptor a hormonas tiroideas (Casanova et al., 1994). Experimentos subsecuentes identificaron al correpresor de receptores nucleares (NcoR) y al silenciador mediador para el receptor a hormonas tiroideas y ácido retinoico (SMRT) (Mc Kenna, et al., 1999).

### 3.3.2 Coactivadores

Los coactivadores de receptores nucleares son una clase proteínas que interactúan con la superfamilia de receptores nucleares para potenciar su efecto en la transcripción de genes blanco y sirven como puente entre la maquinaria de la transcripción basal y el receptor a hormonas esteroides (Rowan et al., 2000). Los coactivadores son capaces de (i) modificar la estructura de la cromatina de los promotores regulados por hormona por actividades intrínsecas de histona acetiltransferasa (HAT), (ii) mediar interacciones entre receptores y otros factores de transcripción y (iii) ensamblar y estabilizar del complejo transcripcional (McKenna et al., 1998, Collingwood et al., 1999).

Los coactivadores se asocian con los receptores nucleares de manera ligando dependiente y los agonistas de los receptores promueven esta interacción. Los coactivadores usualmente interaccionan con la parte C-terminal de los receptores nucleares, a través de los dominios LXXLL, presentes en los coactivadores. Estudios in vitro usando anticuerpos contra los coactivadores indican que éstos son limitantes para la transcripción de genes mediada por los receptores. Se han identificado varios coactivadores como los coactivadores de receptores a hormonas esteroides (SRC), p300/CBP, proteína de interacción con el receptor (RIP), proteína asociada al RE (ERAP) entre otras (Burris y McCabe, 2001) (Tabla 2).

Tabla 2. Coactivadores de los receptores a hormonas esteroideas.

Cofactor	Nombre alternativo	Cofactores relacionados estructuralmente	Función
ERAP-160	GRIP-170, p160	ERAP-140	Interacciona con RE de manera ligando dependiente, interactúa con RG.
RIP-140		RIP-160	Interacciona y coactiva RE, actúa como corepresor para el receptor huérfano TR2.
SRC-1	hSRC-1 NcoA-1 p160	SRC-2, SRC-3	Interacciona y coactiva a RP, RE, RT y RG; interacciona con CBP/p300; posee actividad de histona acetiltransferasa; interacciona con el factor asociado a p300/CBP; contiene dominios autónomos de activación.
ARA-70			Interacciona y coactiva al RA en células de la próstata.
CBP		p300	Interacciona y coactiva a múltiples activadores, RP, RE, RT, RA y RG; interacciona con PCAF, SRC-1, SRC-2 y SRC-3.
p300		CBP	Interacciona y coactiva a RP, RE, RT, RA, y RG, posee actividad de histona acetiltransferasa, interacciona con PCAF, SRC-1 y SRC-3
SRC-2	GRIP-1/mSERC-2 NcoA-2, p160, TIF2	SRC-1, SRC-3	Interacciona y coactiva a RE, RT y RA, interacciona con CBP.
SRC-3	ACTR/hSRC-3, p/CIP/MSRC-3, RAC3/hSRC-3, AIB-1/hSRC, TRAM-1/hSRC-3	SRC-1, SRC-2	Interacciona y coactiva a RT, RP, RAR y RE; posee actividad de histona acetiltransferasa, interacciona con CBP/p300 y PCAF; contienen dominios autónomos de activación.
E6-AP		RPF-1 (hRSp5)	Coactiva e interacciona con RA, RE, RP y RG, E6-AP y RPF-1 interactúan sinérgicamente para aumentar la activación de RP.
PCAF	hGCN5		Posee actividad de acetiltransferasa, interacciona con RP y SRC-1; interacciona con RT y ACTR.

### 3.3.2.1 Coactivador de receptores a hormonas esteroides ( SRC )

La familia de los coactivadores a receptores de hormonas esteroides (SRC) consiste de tres miembros homólogos que son: SRC-1, SRC-2 y SRC-3. SRC-1 (F-SRC-1 o NcoA-1) que interactúa con el RP, el RE, el RT, el RG y también puede interactuar con otros factores de transcripción como AP-1 y NF- $\kappa$ B. SRC-2 (GRIP1, TIF2 o NcoA-2) interacciona con RG, RE, RP y RA. SRC-3 ( p/CIP, RAC-3, ACTR, AIB1 o TRAM-1) interacciona con RP, RE, RG y RT (Xu et al., 2002; Tetel, 2000).

Los dominios funcionales de la familia de SRC son: el dominio Per/ARNT/Sim (PAS: Per, proteína período involucrada en el ciclo circadiano de *Drosophila*, ARNT translocador del receptor nuclear de aril hidrocarburos, Sim, proteína única de *Drosophila*) localizado en la región amino terminal originalmente identificado en *Drosophila*, está involucrado en la unión al DNA y la heterodimerización con proteínas que contienen estos motivos. Este dominio es importante en SRC-2 ya que interacciona con la miogenina, que es un factor de transcripción involucrado en la diferenciación muscular y MEF-2C, involucrado en la diferenciación del músculo esquelético (Chen et al., 2000). La región central contiene 3 motivos LXXLL (L, leucina, X cualquier amino ácido), que son responsables de la interacción con los receptores nucleares.

Hay dos dominios de activación (AD1 Y AD2). La región AD1 es responsable de la interacción con otros coactivadores como CBP y p300, pero no interacciona con los receptores nucleares. AD2 se localiza en la parte carboxilo terminal y es responsable de la actividad de histona acetiltransferasa (HAT) (Fig. 4) ( Xu et al., 2003; McKenna et al., 2002).

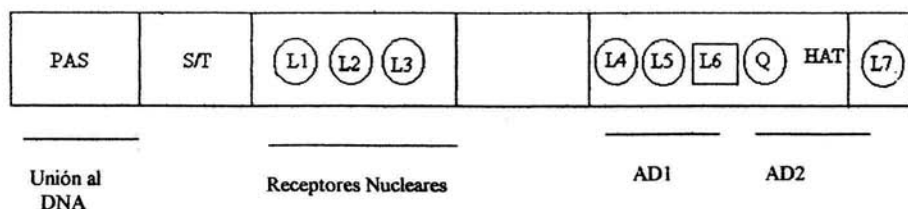


Fig. 4 Estructura y dominios funcionales de SRC. PAS: dominio Per/ARNT/Sim; S/T regiones ricas en Serina-Treonina; L en círculo: motivos LXXLL, L en cuadro: motivos LXXLL atípicos, Q: regiones ricas en glutamina, HAT: actividad de histona acetil transferasa.

SRC-1 se ha localizado en el hipocampo, la amígdala, el hipotálamo, el área preóptica, los ganglios basales y la corteza (Iwazaki T, et al; 2002).

En ratas con hipotiroidismo se ha observado que el tratamiento con propil-tiouracilo + hormona tiroidea disminuye el contenido de SRC-1 a nivel del RNAm en la corteza y el giro dentado mientras que en la región CA3 del hipocampo hay un aumento en la expresión de SRC-1 (Iwazaki, et al., 2002).

Se ha observado que SRC-1 tiene un papel importante en la diferenciación sexual del núcleo dimórfico sexual (NDS) en el hipotálamo de crías de ratas hembras inyectadas con oligonucleótidos antisentido para SRC-1 en el primer día postnatal; tuvieron un volumen menor en el NDS comparadas con el control, esto sugiere que la reducción en el contenido de SRC-1 altera el desarrollo sexual del cerebro (Auger et al., 2000).

Se ha observado que el contenido de SRC-1 puede modificarse por variaciones hormonales por ejemplo: en el pulmón de la rata aumenta durante el diestro y disminuye en el proestro y estro (González-Arenas, et al., 2004).

Se ha observado una regulación tejido-específica de estos cofactores por E2 en homogenados de pituitaria de ratas macho tratadas con E<sub>2</sub>, observándose que la expresión de SRC-1 disminuye a las 6 y 24 horas después del tratamiento (Misiti et al, 2002). En dos áreas involucradas en el comportamiento sexual como son el área preóptica medial y el núcleo paraventricular del hipotálamo se ha observado un aumento en la expresión de SRC-1 a nivel del RNA mensajero en comparación con el diestro, lo cual coincide con el aumento del RNA mensajero de SRC-1 a las 24 h después del tratamiento con E<sub>2</sub> (Mitev et

al., 2003). Hasta el momento se desconoce el patrón de expresión de SRC-1 durante el ciclo estral completo de la rata.

En el cerebro de ratas tratadas con dexametasona, un agonista del RG, el RNAm de SRC-1 se regula a la baja a las 4 horas del tratamiento, mientras que a las 8 horas se recuperan los niveles de SRC-1. La proteína de SRC-1 se regula a la baja a las 12 horas y se recupera a las 24 horas después del tratamiento con dexametasona, esto sugiere que SRC-1 se regula por glucocorticoides (Kurihara, et al., 2002).

### 3.3.3 Correpresores

Los correpresores son proteínas que inhiben la transcripción de genes a través de los siguientes mecanismos (i) el represor se une o se sobrelapa a los sitios de unión a DNA del coactivador y competitivamente bloquea el acceso de este último al DNA; (ii) tanto el coactivador como el represor se unen al DNA en sitios diferentes, pero el represor interfiere con la actividad del coactivador; (iii) el represor se une al DNA y silencia la maquinaria de transcripción basal directamente (Jenster, 1998, Horwitz et al., 1996).

En 1995 se identificó el correpresor de receptores nucleares (NcoR), una proteína de 270 kDa que se asocia a RT y RAR en ausencia de ligando. Otro correpresor de 168 kDa se identificó mediante ensayos de cotransfecciones y se le denominó silenciador mediador para el receptor a hormonas tiroideas y ácido retinoico (SMRT), debido a la interacción con el RT y el RAR. De igual manera se empezaron a conocer otros correpresores que se muestran en la tabla 3 (McKenna et al., 1998).

Estudios *in vitro* demuestran que los correpresores en presencia de agonistas parciales y de antagonistas, reprimen la dimerización y la interacción de los receptores a hormonas esteroides con la histona acetil transferasa (Agoulnik et al., 2003; Burris & McCabe, 2001).

Tabla 3. Correpresores de los receptores a hormonas esteroides

Factor	Nombre alternativo	Cofactores relacionados estructuralmente	Función
NCoR	RIP-13	SMRT	Reprime e interactúa con los receptores RT, RAR, RevErb y DAX-1 en ausencia de ligando; contiene dominios autónomos de represión, reduce la actividad parcial del agonista RU486/RP.
SMRT	TRAC2	NCoR	Reprime e interactúa con los RT y RAR en ausencia de ligando, contiene secuencias similares a NcoR; contiene dominios autónomos de represión; reduce la actividad parcial del agonista tamoxifen/RE y del antagonista RU486/RP.
TRUP	SURF-3, PLA-X, L7a		Reduce la transactivación por RT y RAR; disminuye la unión del DNA y los heterodímeros de RXR.
SUNCoR			Reprime al RT y RevErb.
NURD			Contienen subunidades relacionadas a NcoR; inmunodepleción disminuye la represión por RT.

### 3.3.3.1 Silenciador mediador para el receptor a hormonas tiroideas y ácido retinoico (SMRT)

A SMRT también se le conoce como TRAC2, una proteína aislada de la interacción con RAR, RXR y RT. Tiene similitudes con NcoR que en la parte N-terminal contiene 2 dominios de represión que no están presentes en SMRT.

SMRT presenta en la región N-terminal 4 dominios de represión, de la transcripción (RD), entre el RD1 y RD2 se encuentran 2 dominios SANT (SWI3, ADA2, N-CoR y TFIIB B), que están involucrados en la unión al DNA y en las interacciones con las histonas deacetil transferasas C3 (HDAC), HDAC4 y HDAC5. En la región C-terminal se encuentran los dominios de interacción con los receptores (Fig 5) (Jones y Shi, 2003).

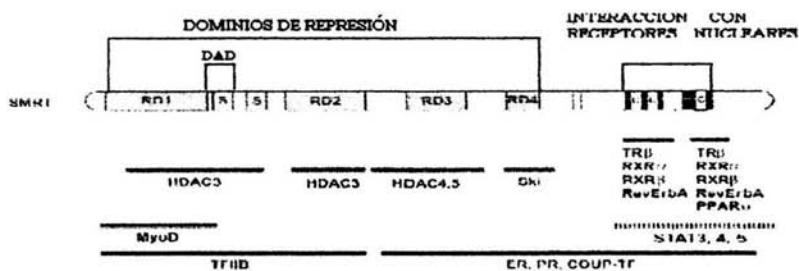


Figura 5. Estructura y dominios funcionales de SMRT. RD: dominios de represión, S: dominios SANT, DAD: dominio de desacetilasa, C: Unión a receptores nucleares.

La represión de la transcripción es afectada en parte por la asociación de receptores sin ligando, o en presencia de antagonistas, con represores como SMRT, el cual interactúa con el RP uniéndose a un dominio de inhibición que está activo en la isoforma A (Giangrande et al, 2000, Guerra-Araiza et al, 2000)

Se ha observado que la expresión de SMRT a nivel del RNAm es tejido-específica. Se ha observado que los niveles de RNAm de SMRT en pituitaria de ratas tratadas con  $E_2$  se regulan positivamente (Misiti et al, 1998). Sin embargo, se desconoce la expresión de SMRT durante el ciclo estral de la rata

En el pulmón de la rata el contenido de SMRT aumenta durante el diestro, disminuye durante el proestro y vuelve a aumentar durante el estro por lo que estos datos sugieren que el  $E_2$  disminuye el contenido de SMRT (Gonzalez-Arenas, et al; 2004).

SMRT se localiza en el hipocampo, hipotálamo, isocorteza, cerebelo, amígdala y ganglios basales (Iwazaki, et al; 2002)

Se ha observado que el  $RE\beta$  se une a SMRT en presencia del agonista dietilstilbestrol y los fitoestrogenos genisteína y coumestrol y que esta interacción es a través del la región AF2, esta interacción es específica para el  $RE\beta$  (Webb, et al., 2003).

La activación de la vía de ERKs (cinasa regulada por señales extracelulares) por L-troxina resulta en la fosforilación de  $RT\beta$  y por lo tanto hay una disociación de SMRT de manera hormona-independiente (Davis et al., 2000).

### 3.4 Ciclos reproductivos

#### 3.4.1 Generalidades

Los ciclos reproductivos en los mamíferos se definen básicamente por el tipo de ovulación: ovulación refleja y ovulación cíclica. En el primero, la ovulación es inducida por el coito o por alguna estimulación comparable en el cuello uterino y la presentan el conejo y el gato, entre otros animales. La ovulación cíclica puede clasificarse con base en la respuesta del epitelio uterino a la estimulación hormonal; de este modo, se tienen los ciclos menstrual y estral. El período de receptividad sexual durante el ciclo menstrual se extiende en la mayor parte del tiempo de duración del ciclo y las capas superficiales del endometrio se desprenden acompañados de una hemorragia (menstruación), mientras que en el ciclo estral, el período de receptividad es restringido y el desprendimiento de las células endometriales no provoca esta hemorragia. El ciclo menstrual, se puede dividir en 4 etapas: el período menstrual, el proliferativo o folicular, el ovulatorio y el progestacional o luteal y se presenta en diferentes especies de primates, mientras que el ciclo estral se presenta en diferentes roedores, bovinos, felinos entre otras especies y se divide en cuatro etapas (Eckert 1990, Knobil et al 1988).

#### 3.4.2 Ciclo estral de la rata

El ciclo estral es un proceso secuencial que determina el estado reproductivo de algunas especies de mamíferos (roedores, felinos, canidos). Éste se puede dividir en cuatro etapas que se caracterizan hormonal y citológicamente en: 1) proestro: se observan células epiteliales nucleadas, 2) estro: se presentan únicamente células epiteliales cornificadas, 3) metaestro: se observa la aparición de leucocitos y pocas células cornificadas y 4) diestro: se observan predominantemente leucocitos. Cada una de ellas dura aproximadamente un día ( Fig.6).

Los niveles de estradiol (E2) en sangre son basales (14 a 20 pg/ml) a través del estro y metaestro, mientras que en la noche del diestro se presenta un incremento (25 a 40 pg/ml) que continúa hasta el proestro para alcanzar su valor máximo (45 a 90 pg/ml) al mediodía de esta etapa (Fig.7.) (Eckert 1990, Knobil et al., 1988).



El aumento de los estrógenos en la sangre desencadena un estímulo neural 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 pituitaria. En la tarde del proestro, los niveles de LH presentan un rápido incremento y el máximo valor en los niveles se alcanza entre las 5:00 y a las 7:00 pm. Este incremento de LH induce la ruptura folicular y la ovulación lo cual se da en las primeras horas de la mañana siguiente, es decir, en el estro.

El pico en la concentración de LH es seguido por un incremento en la secreción de  $P_4$  y unas horas después, se presenta un comportamiento sexual característico de receptividad sexual. Se presentan dos picos en los niveles de secreción de la  $P_4$ : un incremento de origen folicular, el cual tiene lugar durante la tarde y noche del proestro, que ocurre casi simultáneamente con el pico de secreción de LH. Un segundo pico de la  $P_4$  es de origen luteal y tiene lugar cerca del mediodía del metaestro, se prolonga a través de la mañana del diestro y regresa a niveles basales en la tarde de ese mismo día (Knobil et al., 1988).

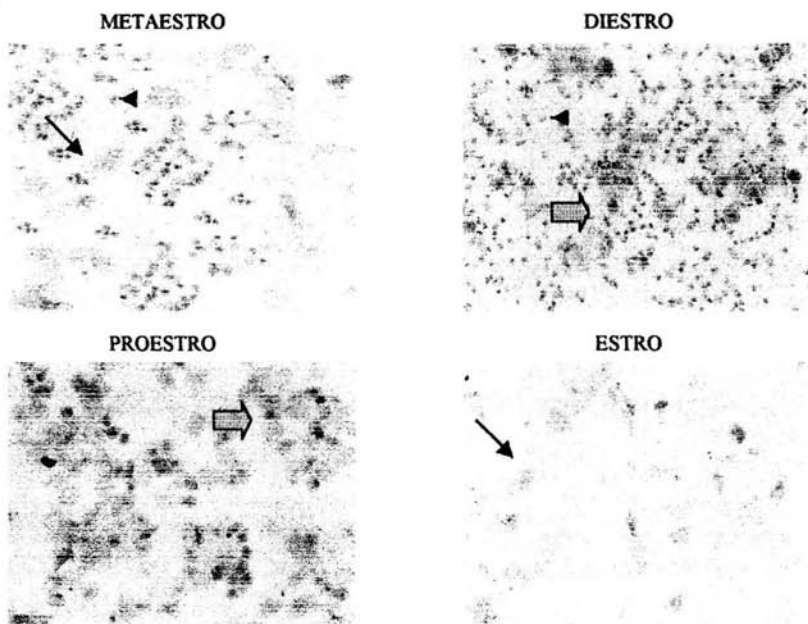


Figura 6. Citología típica del ciclo estral de la rata. Metaestro: leucocitos y pocas células cornificadas; diestro: leucocitos y pocas células nucleadas; proestro: células nucleadas; estro: células cornificadas. Punta de flecha: leucocitos, flecha: células cornificadas, flecha de bloque: células nucleadas.

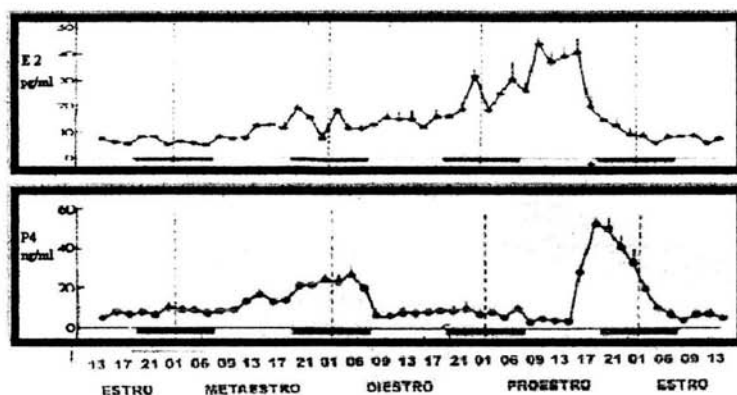


Figura 7. Niveles de E<sub>2</sub> y P<sub>4</sub> a través del ciclo estral de la rata. Las barras negras representan la tarde-noche del día (Tomado de Eckert, 1990).

#### 4. Planteamiento del problema

Las hormonas esteroides participan en la regulación de diversos procesos fisiológicos en el cerebro de los mamíferos, como la conducta sexual, la organización cerebral, la excitabilidad neuronal y la neuroprotección. Uno de los mecanismos de acción de las hormonas esteroides es a través de receptores nucleares que pueden estimular o inhibir la expresión de genes blanco. Las acciones de estos receptores están mediadas en parte por cofactores capaces de aumentar (coactivadores) o disminuir (correpresores) la actividad transcripcional.

Sin embargo, se desconoce el patrón de expresión a nivel de la proteína de los cofactores SRC-1 y SMRT en regiones cerebrales como el hipotálamo, el área preóptica y el hipocampo y a lo largo del ciclo estral de la rata. Por lo que en este proyecto se estudió el patrón de expresión de los cofactores SRC-1 y SMRT a nivel de la proteína en el hipotálamo, el área preóptica y el hipocampo de ratas durante el ciclo estral, usando la técnica de Western Blot.

## 5. Hipótesis

Si la expresión de SRC-1 y SMRT es regulada por  $E_2$  y  $P_4$  y es tejido-específica, entonces se observará una variación en el contenido de estos cofactores en las diferentes áreas del cerebro durante el ciclo estral de la rata cuando los niveles de  $E_2$  y  $P_4$  cambian de manera fisiológica.

## 6. Objetivo General

- Determinar el contenido de los cofactores de los receptores a hormonas esteroides SRC-1 y SMRT en el sistema nervioso central de la rata durante el ciclo estral.

### Objetivos particulares

- Cuantificar la expresión de los cofactores SRC-1 y SMRT a nivel de la proteína en el hipotálamo, el área preóptica y el hipocampo de la rata durante el ciclo estral.
- Determinar la tasa SRC-1/SMRT en cada región cerebral estudiada durante el ciclo estral de la rata.

## 7. Materiales y métodos

### 7.1 Animales de experimentación

Se utilizaron ratas adultas hembras de la cepa Sprague Dawley de 250 g de peso que se mantuvieron con agua y comida *ad libitum*, con un ciclo luz oscuridad de 14:10 h (luz de 6:00-20:00).

### 7.2 Caracterización del ciclo estral

Se determinó la etapa del ciclo estral en la cual se encontraban las ratas intactas por medio del análisis citológico en: 1) proestro: se observan células epiteliales nucleadas, 2)

estro: se presentan únicamente células epiteliales cornificadas, 3) metaestro: se observa la aparición de leucocitos y pocas células cornificadas y 4) diestro: se observan leucocitos.

### **7.3 Obtención de las diferentes regiones cerebrales**

Las ratas que presentaron 3 ciclos regulares se sacrificaron a las 12:00 h en las etapas de proestro, estro, metaestro y diestro y se disecaron las siguientes áreas del cerebro: hipotálamo, hipocampo y área preóptica.

### **7.4 Extracción y cuantificación de proteínas totales**

Se homogenizaron los tejidos en buffer de lisis TDG con un cóctel de inhibidores de proteinasas (Tris-HCl 10 mM, ditioneitol 1mM, glicerol al 30%, triton al 1%, azida de sodio 15 mM, EDTA 1mM, leupeptina 4 µg/ml, aprotinina 22 µg/ml, PMSF 1mM, ortovanadato de sodio 1mM), en una relación de 1 ml de buffer/1 g de tejido a 4°C.

Las muestras homogenizadas fueron centrifugadas a 15,000 rpm, durante 15 min, a 4°C para obtener en el sobrenadante las proteínas totales. La concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford.

### **7.5 Western Blot**

Las proteínas totales obtenidas de los tejidos (100 µg en el caso del área preóptica y 50 µg en el caso del hipotálamo) se separaron por electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 7.5% a 75 volts durante 2 horas. Cada muestra se preparó con Buffer de carga en un volumen 1:1 y se hirvieron durante 5 min para depositarse en los geles antes mencionados.

Las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (Amersham) a 20 volts, durante 1 hora en una cámara semihúmeda. Las membranas fueron bloqueadas por 2 horas a temperatura ambiente con una solución de leche descremada en polvo al 5% y albúmina al 0.5% en TBS 1X.

Las membranas fueron incubadas durante 2 horas a temperatura ambiente con los siguientes anticuerpos policlonales anti SRC-1 (Santa Cruz sc- 6097) o anti SMRT (Santa Cruz sc- 1612) en una concentración de 0.5 µg/ml.

Las membranas fueron lavadas con TBS-Tween 3 veces por 5 minutos.

Para detectar SRC-1 y SMRT, las membranas fueron incubadas con el anticuerpo secundario anti-cabra (IgG-HRP) conjugado a peroxidasa en una concentración de 0.24  $\mu\text{g/ml}$  (Santa Cruz sc-2033). Se utilizó un método de detección de alta sensibilidad por quimioluminiscencia (ECL), (Amersham Pharmacia Biotech) para determinar la presencia de las proteínas estudiadas. En este sistema, el peróxido de luminol (que es un sustrato de la peroxidasa la cual esta acoplada al anticuerpo secundario) genera una señal de quimioluminiscencia que en presencia de un catalizador de la reacción puede detectarse al exponer las membranas a placas radiográficas.

Para corregir las posibles diferencias en la cantidad de proteína total cargada en cada pozo, se lavaron las membranas con glicina ácida toda la noche a 4 °C y 30 min. a 37°C para posteriormente incubarlas con un anticuerpo primario anti-actina en una concentración de 1 $\mu\text{g/ml}$  (Santa Cruz sc-1615) durante 2 horas a temperatura ambiente.

Las membranas fueron lavadas con TBS-Tween 3 veces por 5 minutos. Se incubaron 1 hora con un anticuerpo secundario anti-cabra acoplado a peroxidasa en una concentración de 0.24  $\mu\text{g/ml}$  (Santa Cruz sc-2033) y posteriormente se utilizó el método de detección de alta sensibilidad descrito anteriormente.

## **7.6 Radioinmunoanálisis**

Los niveles séricos de E2 y P4 fueron medidos usando la técnica de Yodo<sup>125</sup>, con el kit Coat-A-Count (Diagnostic Products Corporation), seguido del método descrito por el fabricante. La sensibilidad para el E2 y la P4 con este método fue de 5 pg/ml y 0.02 ng/ml respectivamente.

## **7.7 Análisis de resultados**

Cada placa fue sometida a un análisis densitométrico para cuantificar la expresión de SRC-1, SMRT y  $\beta$ -actina, de acuerdo a la intensidad de cada banda, utilizando el programa Scion Image.

A los datos obtenidos se les aplicó un análisis de varianza y una prueba de t-Student. Se utilizó el programa Prism 2.01 (Graph Pad, CA) para calcular los valores de probabilidad.

## 8. Resultados

Para determinar el contenido de SRC-1 y SMRT durante el ciclo estral de la rata se extrajeron proteínas totales del hipotálamo, del área preóptica y del hipocampo de ratas Sprague Dawley. Se realizaron ensayos de Western Blot como se describió en la sección de Materiales y Métodos.

En la figura 8 se presenta la detección de SRC-1 y SMRT en el hipotálamo. Se detectaron bandas de 160 kDa correspondientes a SRC-1 y SMRT en cada una de las etapas del ciclo estral a las 12:00 horas. Como se observa en las figuras 8 y 9 hubo un incremento significativo en el contenido de SRC-1 durante el proestro que se mantiene durante el estro, mientras que en el caso de SMRT no hubo cambios significativos a lo largo del ciclo (Fig. 9).

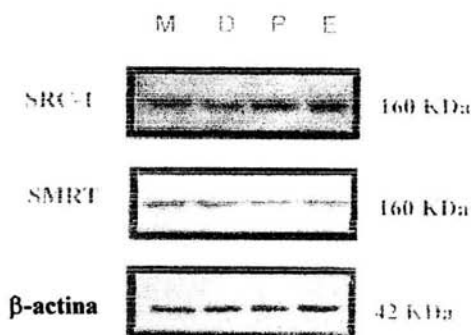


Figura 8. Ensayo de Western Blot de los cofactores SRC-1 y SMRT en el hipotálamo de la rata durante el ciclo estral. Ensayo representativo de 3 experimentos de Western Blot. Se muestra también un ensayo para actina que se utilizó como control de carga. M: metaestro, D: diestro, P: proestro y E: estro.

Por otro lado, al calcular la relación en la expresión de SRC-1/SMRT en el hipotálamo se encontró que SRC-1 predominó durante el ciclo estral (Fig. 10).

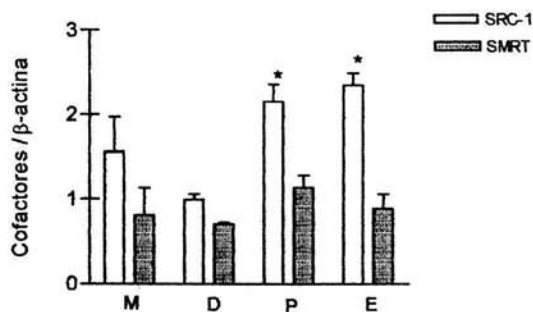


Figura 9. Expresión de los cofactores SRC-1 y SMRT en el hipotálamo de la rata durante el ciclo estral. Los cofactores detectados por Western Blot se cuantificaron por medio de un análisis densitométrico y los valores obtenidos se corrigieron respecto a los de actina. Las gráficas muestran el promedio  $\pm$  E. S. de 3 ensayos. \*  $p < 0.05$  vs diestro. M: metaestro, D: diestro, P: proestro y E: estro.

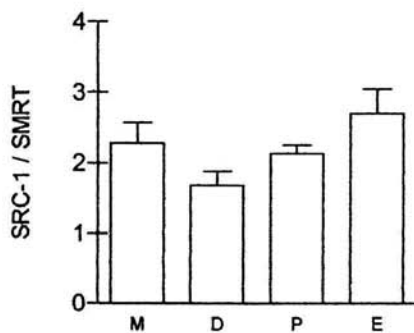


Figura 10. Relación SRC-1/SMRT en el hipotálamo de la rata. Se realizó el análisis densitométrico de 3 ensayos de Western Blot, posteriormente se calculó la relación SRC-1/SMRT en las diferentes etapas del ciclo estral. En la gráfica se muestra el promedio  $\pm$  E. S. M: metaestro, D: diestro, P: proestro y E: estro.

En el área preóptica se observa un decremento significativo en el contenido de SMRT en el metaestro en comparación con los otros días del ciclo estral, mientras que en el caso de SRC-1 no se observan cambios significativos durante el ciclo estral (Figs. 11 y 12).

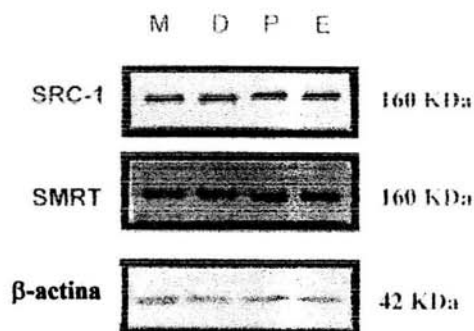


Figura 11. Ensayo de Western Blot de los cofactores SRC-1 y SMRT en el área preóptica de la rata durante el ciclo estral. Ensayo representativo de 3 experimentos de Western Blot. Se muestra también un ensayo para actina que se utilizó como control de carga. M: metaestro, D: diestro, P: proestro y E: estro.

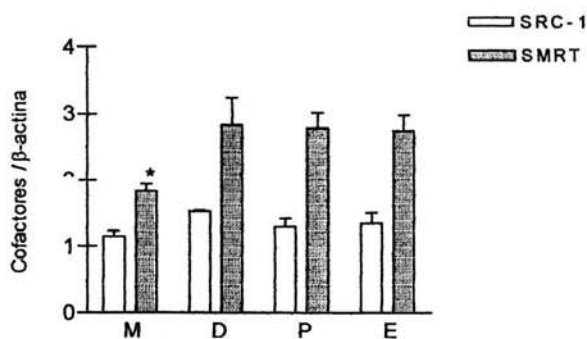


Figura 12. Expresión de los cofactores SRC-1 y SMRT en el área preóptica de la rata durante el ciclo estral. Los cofactores detectados por Western Blot se cuantificaron por medio de un análisis densitométrico y los valores obtenidos se corrigieron respecto a los de actina. Las graficas muestran el promedio  $\pm$  E. S. de 3 ensayos.\*  $p < 0.05$  vs proestro y estro. M: metaestro, D: diestro, P: proestro y E: estro.



De forma contraria a lo observado en el hipotálamo, en el área preóptica SMRT fue el cofactor predominante (Fig. 13). Al igual que en el hipotálamo, en el área preóptica no se encontraron diferencias significativas en la tasa de expresión SRC-1/SMRT (Fig. 13).

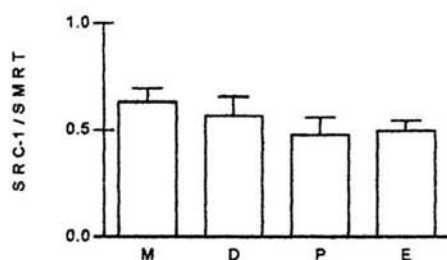


Figura 13 Relación SRC-1/SMRT en el área preóptica de la rata durante el ciclo estral. Se realizó el análisis densitométrico de 3 ensayos de Western Blot, posteriormente se calculó la relación SRC-1/SMRT en las diferentes etapas del ciclo estral. En la gráfica se muestra el promedio  $\pm$  E. S. M: metaestro, D: diestro, P: proestro y E: estro.

En la figura 14 se muestra la detección de los cofactores SRC-1 y SMRT en el hipocampo de la rata. Como se observa en esta figura no hubo cambios significativos en el contenido de los cofactores a lo largo del ciclo estral, lo cual se refleja en la figura 15, donde se muestra el análisis densitométrico del contenido de estos cofactores.

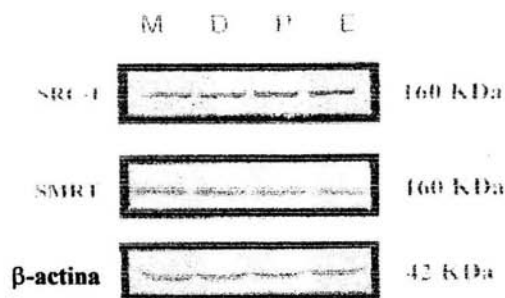


Figura 14. Ensayo de Western Blot de los cofactores SRC-1 y SMRT en el hipocampo de la rata durante el ciclo estral. Ensayo representativo de 3 experimentos de Western Blot. Se muestra un Western Blot para actina que se utilizó como control de carga. M: metaestro, D: diestro, P: proestro y E: estro.

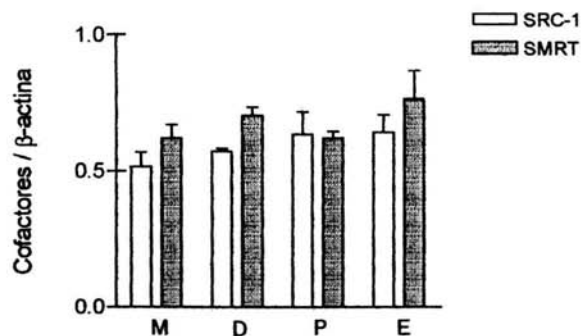


Figura 15. Expresión de los cofactores SRC-1 y SMRT en el hipocampo de la rata durante el ciclo estral. Los cofactores detectados por Western Blot se cuantificaron por medio de un análisis densitométrico y los valores obtenidos se corrigieron respecto a los de actina. Las graficas muestran el promedio  $\pm$  E. S. de 3 ensayos. M: metaestro, D: diestro, P: proestro y E: estro.

Para el caso del hipocampo, al calcular la relación de la expresión SRC-1/SMRT no cambio ni no hubo predominio de alguno de los dos cofactores a lo largo del ciclo estral (Fig. 16).

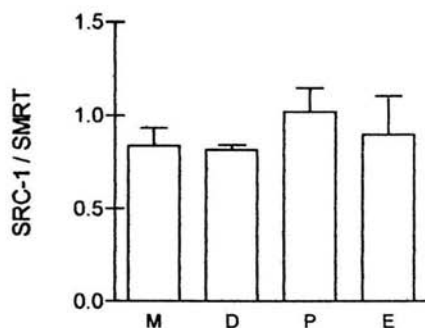


Figura 16. Relación SRC-1/SMRT en el hipocampo de la rata durante el ciclo estral. Se realizó el análisis densitométrico de 3 ensayos de Western Blot, posteriormente se calculó la relación SRC-1/SMRT en las diferentes etapas del ciclo estral. En la gráfica se muestra el promedio  $\pm$  E. S.

Las concentraciones séricas de E<sub>2</sub> y P<sub>4</sub> a lo largo del ciclo estral fueron determinadas por radioinmunoanálisis. Las concentraciones séricas más altas de E<sub>2</sub> y P<sub>4</sub> se observaron en los días del proestro y el metaestro respectivamente.

**Tabla 4. Niveles séricos de E2 y P4 en ratas hembras durante el ciclo estral.**

Día	E2 (pg/ml)	P4 (ng/ml)
Metaestro	15.64 ± 1.01*	12.83 ± 2.33 <sup>‡</sup>
Diestro	8.04 ± 2.63	10.47 ± 4.73
Proestro	38.57 ± 4.77*	5.90 ± 2.57
Estro	6.82 ± 1.33	4.63 ± 1.37

Las concentraciones de esteroides se determinaron por radioinmunoanálisis. Los datos expresan el promedio ± E.S. de 3 animales/grupo. \* p<0.05 comparado con los otros grupos. \*\*p<0.05 comparado con metaestro, proestro y estro. <sup>‡</sup> p<0.05 comparado con proestro y estro.

## 9. Discusión

En este trabajo se estudió el contenido al nivel de la proteína de 2 de los cofactores de los receptores a hormonas esteroides SRC-1 y SMRT durante el ciclo estral de la rata, mediante el uso de la técnica de Western Blot.

Los resultados obtenidos muestran que existe un contenido diferencial de los cofactores en las regiones cerebrales estudiadas. En el hipotálamo de la rata se observa un incremento significativo de SRC-1 en el proestro cuando los niveles de E<sub>2</sub> tienen su valor máximo, esto coincide con el alto contenido del RP, lo cual sugiere que SRC-1 y el RP interactúan en esta región durante el proestro para modular la transcripción mediada por la P<sub>4</sub>.

En el caso del área preóptica se observa un incremento significativo de SMRT durante el proestro cuando se tienen los valores máximos de E<sub>2</sub> y este incremento se mantiene durante el estro.

Se ha reportado que en el núcleo ventromedial del hipotálamo la expresión del RNAm de SRC-1 es mayor durante el proestro que en el diestro, esto sugiere que la expresión de SRC-1 en el hipotálamo de la rata se regula a nivel transcripcional.

En el ovario de tres especies de animales domesticados (oveja, vaca y cerdo) la expresión de SRC-1 fue más alta durante la fase del estro que durante la fase lutea. La expresión de SRC-1 y SMRT también cambia en el endometrio humano durante el ciclo menstrual. En estos estudios se observó que durante la menstruación y la fase proliferativa hay una alta expresión de SRC-1 y una disminución significativa en la fase secretora, mientras que la inmunotinción para SMRT disminuyó en las células del estroma durante la fase secretora (Weiser, et al; 2002; Shiozawa, et al; 2003).

Estos estudios sugieren que las hormonas sexuales participan en la regulación de la expresión de SRC-1 y SMRT en diferentes tejidos de diversas especies de mamíferos durante los ciclos reproductivos. Se ha reportado que el E<sub>2</sub> regula la expresión del RNAm de SRC-1 y SMRT de manera tejido-específica en la rata (Mitev; 2003; Misiti, et al; 1998).

En la pituitaria de ratas macho el E<sub>2</sub> disminuye la expresión de SRC-1 y SMRT, mientras que en ratas ovariectomizadas la expresión del RNAm de SRC-1 es inducida por la administración de E<sub>2</sub> en el núcleo paraventricular del hipotálamo, lo cual concuerda con lo observado para SRC-1 en el hipotálamo, ya que hay un aumento significativo durante el proestro cuando hay un aumento en los niveles de E<sub>2</sub> en comparación con el diestro. El aumento en el contenido de SRC-1 durante el proestro se mantuvo hasta el estro lo cual puede ser reflejo del efecto del E<sub>2</sub> en la expresión del RNAm de SRC-1 que se observa 24 horas después de su administración (Mitev, 2003).

Los cambios en el contenido de SRC-1 y SMRT en el cerebro de la rata durante el ciclo estral se presentaron de manera tejido-específica, en el caso de SRC-1 sólo se observaron variaciones en el hipotálamo pero no en el área preóptica ni en el hipocampo, mientras que el contenido de SMRT sólo se modificó en el área preóptica donde ocurre una disminución en el metaestro en comparación con los otros días del ciclo. Se ha observado una regulación tejido-específica del RNAm de SRC-1 y SMRT por E<sub>2</sub> en otros tejidos de la rata (Misiti, et al., 1998; Nephew, et al.; 2000).

El contenido de SRC-1 comparado con el de SMRT durante el ciclo estral fue diferente en las regiones analizadas. SRC-1 fue el cofactor predominante en el hipotálamo, mientras que SMRT fue predominante en el área preóptica, y en el

hipocampo no hubo predominancia de ningún cofactor. Se ha observado que en células HeLa y T47D el antagonista del RP, RU486 actúa como agonista cuando la tasa SRC-1/NcoR + SMRT es de 2.4 y como un antagonista cuando la tasa es de 0.8 (Liu et al; 2002). Por lo anterior los datos de este trabajo sugieren que la tasa SRC-1/SMRT puede modular la actividad transcripcional del RP y del RE en las diferentes regiones del cerebro de la rata.

Estos datos sugieren que la fluctuación fisiológica de las hormonas esteroides, regula el contenido y la tasa de SRC-1 y SMRT en el cerebro de la rata y es tejido-específica.

## 10. Conclusiones

- Los cofactores de los receptores a hormonas esteroides SRC-1 y SMRT presentan cambios en su contenido de manera tejido-específica en el cerebro de la rata durante el ciclo estral.
- El contenido de SRC-1 aumentó durante el proestro y disminuyó durante el diestro en el hipotálamo.  
En el área preóptica el cofactor que cambió a lo largo del ciclo estral fue SMRT cuyo contenido disminuyó durante el metaestro .  
En el caso del hipocampo no se observaron cambios a lo largo del ciclo estral en ninguno de los cofactores estudiados.
- En el hipotálamo el cofactor predominante fue SRC-1 durante el ciclo estral mientras que en el área preóptica fue SMRT.

## 11. Referencias

- 
- Agoulnik IU, Krause WC, Bingman WE, Rahman HT, Amrikachi M, Ayala GE, Weigel NL. Repressors of androgen and progesterone receptor action. *Journal of Biological Chemistry*. 278:31136-48, 2003.
- Bramley, T., Non-genomic Progesterone Receptors in the Mammalian Ovary: Some Unresolved Issues, *Reproduction*, 125, 3-15, 2003.
- Burris T, McCabe E (eds). Nuclear receptors and genetic disease. Academic Press. USA. 419 pp. 2001.
- Camacho-Arroyo I, Pasapera A.M, Pérez-Palacios G y Cerbón MA. *Revista de Investigación Clínica*. 47: 329-340, 1995
- Chen SL, Dowhan DH, Hosking BM, Muscat GE. The steroid receptor coactivator, GRIP-1, is necessary for MEF-2C-dependent gene expression and skeletal muscle differentiation. *Gene Development* 14:1209-28, 2000.
- Collingwood TN, Urnov FD, Wolffe AP. Nuclear receptors: coactivators, corepressors and chromatin remodeling in the control of transcription. *Journal of Molecular Endocrinology* 23: 255-75,1999.
- Davis, P, Shih J, Lin A, Martino, L. J. and Davis, F. B. Thyroxine promotes association of mitogen-activated protein kinase and nuclear thyroid hormone receptor (TR) and causes serine phosphorylation of TR. *Journal of Biological Chemistry*. 275, 38032-38039, 2000.
- Eckert R. Animal physiology: mechanisms and adaptation. 3<sup>rd</sup> ed. W. H. Freeman and Company. New York,1990.
- Evans R. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science*. 240:889-895, 1988.
- Falkenstein, E., Tillman C., Christ M., Feuring, M., y Wehling, M., Multiple actions of steroid hormones—A focus on rapid, nongenomic effects, *Pharmacology Review*, 52:513-555, 2000.

- Felig, P, Baxter D.J, Forman. *Endocrinology and Metabolism*. McGraw Hill, New York, 1995.
- González-Arenas AA, Reyna-Neyra A, Gómez MJ, Méndez I, Larrieta-Carrasco ME Haces ML, Jiménez B, Camacho-Arroyo I. Los mensajeros químicos del sistema neuroendócrino. *Educación Química*. 3: 158-162, 2001..
- González-Arenas A, Neri-Gómez T, Guerra-Araiza C, Camacho-Arroyo I. Sexual dimorphism in the content of progesterone and estrogen receptors; and their cofactors in the lung of adult rats. *Steroids*, 2004.
- Greenspan, F.S. y Strewler, G.J., *Endocrinología básica y clínica*. Manual Moderno, México, 967 pp. 1998.
- Gronemeyer H. Transcription activation by estrogen and progesterone receptors. *Annual Review of Genetics*, 25: 89-123, 1991.
- Guerra-Araiza C y Camacho-Arroyo I. Las isoformas del receptor a progesterona: regulación y función. *Revista de Investigación Clínica*;52:686-691, 2000.
- Horwitz KB, Jackson TA, Bain DL, Takimoto JK, Tung L.. Nuclear receptor coactivators and corepressors. *Molecular Endocrinology*. 10: 1167-77,1996.
- Jenster G. Coactivators and corepressors as mediators of nuclear receptor function: An up date. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 143:1-7, 1998.
- Jones PL, Shi YB. N-CoR-HDAC Corepressor Complexes:Roles in Transcriptional Regulation by Nuclear Hormone Receptors. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 274:237-68. 2003.
- Knobil E and Neil J (eds). *The physiology of reproduction*. Raven Press, Ltd. , New York. 3250pp. 1988.
- Kraus WL, Katzenellenbogen BS. Regulation of progesterone receptor gene expression and growth in the rat uterus: modulation of estrogen actions by the progesterone and sex steroid hormone antagonist. *Endocrinology*. 132:2371-2379,1993.
- Kurihara I, H Shibata, T Suzuki, T Ando, S Kobashi, M Hayashi, T Saito, T Saruta. Expression and regulation of nuclear receptor coactivators in glucocorticoid action. *Molecular Endocrinology* 189:181-9. 2002.



- Kurjara I, Shibata H, Suzuki T, Ando T, Kobashi S, Hayashi M, Saito T, Saruta T. Expression and regulation of nuclear receptor coactivators in glucocorticoid action. *Molecular endocrinology*. 189:181-9, 2002.
- Liu Z, Auboeuf D, Wong J, Chen JD, Tsai S, Tsai MJ, O'Malley BW. Coactivator/corepressor ratios modulate PR-mediated transcription by the selective receptor modulator RU486. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 99:7940-7944, 2002.
- McKenna JN, Z Nawaz, SY Tsai, M Tsai, BW O'Malley. Distinct steady-state nuclear receptor coregulator complexes exist *in vivo*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95:11697-11702, 1998.
- McKenna NJ, BW O'Malley. Minireview: nuclear receptor coactivators- an update. *Endocrinology*. 143:2461-1465, 2002.
- McKenna NJ, RB Lanz, BW O'Malley. Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocrine Reviews* 20:321-344, 1999.
- Misiti S, L Schomburg, PM Yen, WW Chin. Expression and hormonal regulation of coactivator and corepressor genes. *Endocrinology* 139:2493-2500, 1998.
- Mitev Y, S Wolf, O. F. X. Almeida, V. K. Patchev. Developmental expression profiles and distinct regional estrogen responsiveness suggest a novel role for the steroid receptor coactivator SRC-1 as a discriminative amplifier of estrogen signaling in the rat brain *The FASEB Journal* 2003.
- Molenda HA, Griffin AL, Auger AP, McCarthy MM, Tetel MJ. Nuclear receptor coactivator modulate hormone-dependent gene expression in brain and female reproductive behavior in rats. *Endocrinology* 143:436-44, 2002.
- Nephew P, Ray S, Hlaning M, Ahluwalia A, Wu SD, Long X, Hyder SM, Bigsby RM. Expression of estrogen receptor coactivators in the rat uterus. *Biology of Reproduction*. 63: 361-367. 2000.

- Prieto A, O, Villamar-Cruz, M Saqui-Salces, T Neri-Gómez, A Almaraz-Nieves, V. I. Hernández-Molina, H Valdez Rodríguez e I Camacho-Arroyo. Cómo actúan las hormonas. *Educación Química* 14:196-201, 2003.
- Rowan GB, O'Malley BW. Progesterone receptor coactivators. *Steroids* 65:545-49, 2000.
- Shiozawa H, Shih C, Miyamoto T, Feng YZ, Uchikawa J, Itih K, Konishi I. Cyclic changes in the expression of steroid receptor coactivators and corepressors in the normal human endometrium. *Journal of Clinical Endocrinology Metabolism*. 88: 871-878. 2003.
- Tetel MJ. Nuclear receptor coactivators in neuroendocrine function. *Journal of Neuroendocrinology* 12: 927-932, 2000.
- Webb P, Valentine C, Nguyen P, Price Jr RH, Marimuthu A, West BL, Baxter JD, Kushner PJ. ER $\beta$  binds N-CoR in the presence of estrogens via an LXXLL-like Motif in the N-CoR C-terminus. *Nuclear Receptor* 1:1-15, 2003.
- Weiser C, Schneeberger G, Hudelist C, Singer C, Kurz F, Negele C, Grubewr J, Huber C, Tschugguel W. Endometrial nuclear receptor co-factors SRC-1 and N-CoR are increased in human endometrium during menstruation. *Molecular Human Reproduction*. 8:644-650. 2002.
- Xu J, BW O'Malley. Molecular mechanisms and cellular biology of the steroid receptor coactivator (SRC) family in steroid receptor function. *Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders* 3:185-192, 2002.
- Xu J, Q Li. Review of the in vivo functions of the p160 steroid coactivator family. *Molecular Endocrinology* 17: 1681-1692, 2003.

## 12. Apéndice

### TBS

Tris base	50mM
NaCl	150mM
*pH 7.5	

### Solución de corrida

Tris base	25mM
Glicina	192mM
SDS	10%

### Solución de transferencia 1X

Tris base	48mM
Glicina	39mM
SDS	0.37%
Metanol	20%

### Solución de bloqueo

Leche descremada en polvo	5%
Albúmina	0.5%
* preparar en TBS pH 7.5	

### Buffer de lisis

DTT	1mM
Tris HCl	10mM
Glicerol	30%
EDTA	1mM
Tritón	1%
Leupeptina	4µg/ml
Aprotinina	22.5µg/ml
PMSF	1mM
Ortovanadato	1mM
Azida	15mM
* preparar en TBS pH 7.5	

### Buffer de carga

Tris base	50mM
SDS	2%
$\beta$ -Mercaptoetanol	5%
Bromofenol	0.1%
Glicerol	10%

### Anticuerpos utilizados

- Anticuerpo policlonal anti SRC-1 (IgG) (santa Cruz sc 6097)
- Anticuerpo policlonal anti SMRT (IgG) (santa Cruz sc 1612)
- Anticuerpo anti-actina (Santa Cruz sc 1615)
- Anticuerpo anticabra (IgG-HRP) conjugado a peroxidasa (Santa Cruz sc 2033)