



UNIVERSIDAD NACIONAL **UN/M**
AUTÓNOMA DE MÉXICO POSGRADO 

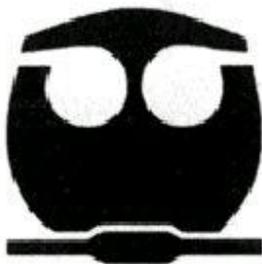
FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN
CIENCIAS BIOQUÍMICAS

MECANISMOS MOLECULARES INVOLUCRADOS EN
LA REGULACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN DE LOS
ESPITELIOS UTERINOS DURANTE LA TRANSICIÓN
ESTRO-METAESTRO DEL CICLO ESTRAL DE LA
RATA

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)
P R E S E N T A :
NOEMI BARANDA AVILA

Tutor: Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes



MÉXICO, D. F.

Noviembre 2010



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

ENTIDADES ACADÉMICAS CAMPUS CIUDAD DE MÉXICO

PMDCB/1377/2009

QFB. NOEMÍ BARANDA AVILA
Alumna del Doctorado en Ciencias Bioquímicas
Presente

Los miembros del Subcomité Académico en reunión ordinaria del día 26 de octubre del presente, 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 "Mecanismos moleculares involucrados en la regulación de la proliferación celular del epitelio uterino durante la transición estro-metaestro del ciclo estral de la rata", dirigida por el Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes.

De su análisis se acordó nombrar el siguiente jurado:

| | |
|-------------------|-----------------------------|
| PRESIDENTE | Dr. Jorge Vázquez Ramos |
| VOCAL | Dr. Edgar Zenteno Galindo |
| SECRETARIO | Dra. Marcela Lizano Soberón |
| SUPLENTE | Dra. Ma. Elena Ibarra Rubio |
| SUPLENTE | Dr. Angel Zarain Herzberg |

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 28 de octubre de 2009.
EL COORDINADOR DE LA ENTIDAD ACADÉMICA-FQ


DR. ROGELIO RODRÍGUEZ SOTRES

C.c.p. Archivo

RRS*155

Mecanismos moleculares involucrados en la regulación de la proliferación de los epitelios uterinos durante la transición estro-metaestro del ciclo estral de la rata

RECONOCIMIENTOS

Esta tesis doctoral se realizó bajo la dirección del Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes en el laboratorio de Biología de la Reproducción, del Departamento de Biología de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Reconozco y agradezco a los miembros de mi Comité Tutorial, quienes me ayudaron con su asesoría, consejos y amistad a culminar de la mejor manera este trabajo.

| | |
|------------------------------------|---------------------------------------|
| Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes | Facultad de Química, UNAM |
| Dra. Martha Robles Flores | Facultad de Medicina, UNAM |
| Dra. Marina Macías Silva | Instituto de Fisiología Celular, UNAM |

Se reconoce a la Universidad Nacional Autónoma de México, especialmente a la Facultad de Química, por abrirme sus puertas al conocimiento, por ser lugar donde la pluralidad y la tolerancia conviven, y por que a lo largo de mi vida ha sido un segundo hogar.

Quisiera expresar mi reconocimiento al Dr. Marco A. Cerbón Cervantes, quien además de ser el director de esta tesis, es sin duda una de las personas que más ha contribuido a mi formación profesional. ¿Por qué mil palabras?, solo elijo una: GRACIAS.

Se reconoce la asesoría de la Dra. C. Adriana Mendoza Rodríguez quien me apoyo durante la realización de esta tesis y evitó en muchas ocasiones que cometiera errores muy graves.

Se reconoce al Dr. Ignacio Camacho Arroyo quien me ayudo en la revisión de los artículos derivados de esta tesis.

El que recibe nunca debe olvidar por eso quiero enfatizar mi reconocimiento a todos y cada uno de mis compañeros del laboratorio: América, Caro, Daniel, Elizabeth, Francisco, Francisco Javier, Gaby, Karina, Luciano, Luz, Mónica, Montse, Naty, Nacho y Sonia por que todos contribuyeron de una u otra manera en la elaboración de esta tesis.

Se reconoce a Lety García y Adelina González por su apoyo y orientación en todos los aspectos administrativos durante el desarrollo del doctorado.

Se reconoce la asesoría técnica de la MVZ Lucía Macías del Bioterio de la Facultad de Química de la UNAM por el manejo del material biológico.

El proyecto fue apoyado parcialmente por CONACYT (P47829-Q y 46759-Q), PAPIIT (IN207207) y PAIP (6190-08). Durante los estudios de doctorado goce de una beca otorgada por CONACYT.

Reconozco y agradezco ampliamente las críticas y comentarios de los miembros del Jurado de Examen Doctoral que estuvo constituido por:

| | | |
|------------|-----------------------------|------------------------------------|
| Presidente | Dr. Jorge Vásquez Ramos | Facultad de Química, UNAM |
| Vocal | Dr. Edgar Zenteno Galindo | Facultad de Medicina, UNAM |
| Secretario | Dra. Marcela Lizano Soberón | Instituto Nacional de Cancerología |
| Suplente | Dra. Ma. Elena Ibarra Rubio | Facultad de Química, UNAM |
| Suplente | Dr. Angel Zarain Herzberg | Facultad de Medicina, UNAM |

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, Teresita y Ubaldo: Gracias mamá por que cuando era niña tus brazos siempre se abrieron cuando quise un abrazo, por que en mi adolescencia no dudaste en regañarme cuando me hacía falta una lección y por que cuando fue necesario me impulsaste para lograr todos mis sueños, a ti mami por que me has transmitido la alegría de la vida y por ser el rostro de una mujer excepcional, te amo. Gracias papá por que lo que soy y seré, es en gran parte a la educación y al sentido de la responsabilidad que siempre me has inculcado, por ser digno ejemplo de honestidad y lucha, por tu amor, tu comprensión y apoyo sin condiciones ni medida y por que recuerdo que cuando era niña te veía como un gigante y hoy que soy adulta te veo aún más grande. Te amo papi.

A mi hermano Héctor: Contigo, las palabras como recurso se agotan, más no ese cariño y admiración que como hermana siento por ti. Doy gracias por que juntos tuvimos una infancia feliz en donde las travesuras no encontraron un fin. Hoy hurgando en el equipaje de mis sentimientos encontré un: ¡gracias por ser mi hermano!

A mi abuelita Panchita por su gran corazón y a mi abuelito Agustín por su increíble fortaleza.

A mis abuelitos Gloria y José Encarnación que aunque ya no están conmigo, viven en mis recuerdos y en mi corazón. De igual manera a mi tía Estela quien siempre demostró ser una gran hija, madre, hermana y mujer.

A toda mi familia, pues ustedes son el pilar más importante en mi vida.

A Enrique, por que sin pensarlo ni pedirlo un día apareciste, por que sin darme cuenta ya eras parte de mi, por todos los sueños compartidos, por llenar mi vida de amor, por los cuatro que seremos, pero sobre todo por un futuro juntos. Te amo....

A todos mis amigos, gracias. Anel, Pato, Oscar y Josué por el apoyo y la amistad que ha perdurado a lo largo de tanto tiempo. Miguel Martínez, Miguel Vilchis, José, Carlos y Susana, gracias por ser parte de mi vida, por todas las experiencias compartidas, por el tiempo y cosas que hemos hecho juntos, pero sobre todo por su amistad. América, Sonia, Raquel y Eli, como olvidar estas frases tan célebres: idea ilógica, nota mental, X y directo al fray, como olvidar la risa de Raquel cuando Sonia me puso el pie (una de tantas veces) y mi cara tocó el piso o de todas las veces en que he estado y sigo estando en la libreta de Vanoye (ya bórrame!!), a ustedes cuatro les doy las gracias por todas las risas compartidas, por todos los consejos y apoyo brindados, por todos los festejos realizados y por compartir conmigo no sólo el interés en la investigación, sino la vida misma.

Y en general a todas las personas con las que he convivido, GRACIAS.

Índice

| | |
|---|------------|
| Índice de Figuras y Tablas | I |
| Abreviaturas | III |
| Resumen | V |
| Abstract | VI |
| 1. Introducción | 1 |
| 2. Antecedentes | 3 |
| 2.1 Ciclo estral de la rata | 3 |
| 2.1.1 Generalidades | 3 |
| 2.1.2 Niveles hormonales | 4 |
| 2.1.3 Cambios morfológicos del útero | 6 |
| 2.1.4 Proliferación celular del útero | 8 |
| 2.2 Receptores a estrógenos y progesterona | 9 |
| 2.2.1 Estructura de los receptores a estrógenos y progesterona | 12 |
| 2.2.2 Mecanismo de acción del receptor a estrógenos | 13 |
| 2.3 Regulación de la expresión de proto-oncogenes por hormonas esteroides | 14 |
| 2.3.1 Función de AP-1 en la proliferación celular | 16 |
| 2.4 Ciclo celular | 17 |
| 2.4.1 Regulación de la fase G1 del ciclo celular por estrógenos | 18 |
| 2.5 Vía de Señalización de Akt/PKB y su regulación por estrógenos | 19 |
| 2.6 Antiestrógenos | 23 |
| 2.6.1 Mecanismo de acción del antiestrógeno ICI 182,780 | 24 |
| 3. Planteamiento del Problema | 28 |
| 4. Hipótesis de Trabajo | 29 |
| 5. Objetivos | 30 |
| 5.1 Objetivo general | 30 |
| 5.2 Objetivos particulares | 30 |
| 6. Materiales y Métodos | 31 |
| 6.1 Animales | 31 |
| 6.2 Tratamientos | 31 |
| 6.2.1 Animales intactos | 31 |
| 6.2.2 Animales ovariectomizados | 32 |

| | |
|---|-----------|
| 6.3 Procesamiento del tejido | 32 |
| 6.3.1 Para determinación de proliferación celular e inmunohistoquímica | 32 |
| 6.3.2 Para western blot | 33 |
| 6.4 Determinación de proliferación celular | 33 |
| 6.5 Inmunohistoquímica | 33 |
| 6.6 Western blot | 34 |
| 6.7 Radioinmunoensayo | 35 |
| 6.8 Análisis estadístico | 35 |
| 7. Resultados | 36 |
| 7.1 Patrón de proliferación celular de los epitelios uterinos de la rata durante la transición estro-metaestro | 36 |
| 7.2 Expresión de la proteína del RE- α en los epitelios uterinos de la rata durante la transición estro-metaestro | 39 |
| 7.3 Expresión de la proteína de Fos en los epitelios uterinos de la rata durante la transición estro-metaestro | 39 |
| 7.4 Curso temporal de expresión de ciclina D1 y D3 durante la proliferación de las células epiteliales uterinas | 42 |
| 7.5 Cdk 4 y Cdk 6 presentan una constante localización nuclear en los epitelios uterinos a lo largo de la transición estro-metaestro | 45 |
| 7.6 Concentración sérica de E ₂ y P ₄ durante el ciclo estral de la rata | 45 |
| 7.7 ICI 182,780 bloquea la incorporación del BrdU en los epitelios uterinos de ratones y ratas ovx pero no en ratas intactas durante el ciclo estral | 50 |
| 7.8 Cambios inducidos por ICI 182,780 sobre el peso húmedo del útero de ratas ovx tratadas con E ₂ y de ratas intactas durante el ciclo estral | 54 |
| 7.9 Efecto de ICI 182,780 sobre la expresión de la proteína del RE- α en el útero de animales ovx tratados con E ₂ y de animales intactos durante el ciclo estral | 55 |
| 7.10 Efecto de ICI 182,780 sobre la expresión de la proteína del RP en el útero de animales ovx tratados con E ₂ y en animales intactos durante el ciclo estral | 57 |
| 7.11 Expresión y localización de ciclina D1 en el útero de animales intactos durante el ciclo estral después del tratamiento con ICI 182,780 | 57 |
| 7.12 La inhibición de la vía de señalización del RE- α por ICI 182,780 induce un aumento en la fosforilación de Gsk3- β Ser ⁹ en el útero de animales intactos durante el ciclo estral | 59 |
| 7.13 La expresión de la forma fosforilada de Akt en el útero de animales durante el ciclo estral es afectada por el antagonista estrogénico ICI 182,780 | 63 |
| 7.14 Concentración sérica de E ₂ y P ₄ en animales intactos después de la administración de ICI 182,780 | 64 |

| | |
|---|-----------|
| 8. Discusión | 65 |
| 8.1 Proliferación de los epitelios uterinos durante la transición estro-metaestro del ciclo estral de la rata | 65 |
| 8.2 Patrón de expresión del RE- α , Fos, ciclina D1, ciclina D3, Cdk4 y Cdk6 durante la transición estro-metaestro del ciclo estral de la rata | 67 |
| 8.3 Efecto del tratamiento con ICI 182, 780, antagonista estrogénico, sobre la proliferación celular y proteínas reguladas por el E ₂ en el útero de ratas ovx y durante el ciclo estral | 70 |
| 9. Conclusiones | 74 |
| 10. Perspectivas | 75 |
| 11. Referencias | 76 |
| 12. Anexos | 86 |

Índice de Figuras y Tablas

| | | |
|-------------|--|----|
| Figura i. | Etapas del ciclo estral de la rata | 4 |
| Figura ii. | Concentraciones hormonales durante el ciclo estral | 5 |
| Figura iii. | Cambios morfológicos del útero de la rata durante el ciclo estral | 8 |
| Figura iv. | Estructura de los receptores a estrógenos y progesterona | 12 |
| Figura v. | Vía de señalización de PI3K/AKT/Gsk3 β | 22 |
| Figura vi. | Estructura química del 17 β -estradiol y de algunos antiestrógenos | 24 |
| Figura vii. | Mecanismo de acción del 17 β -estradiol y fulvestrant (ICI 182,780) | 25 |
| Figura 1. | El epitelio glandular uterino de la rata prolifera antes que el epitelio luminal durante el ciclo estral | 37 |
| Figura 2. | Cuantificación de la incorporación de BrdU en los epitelios uterinos de la rata durante la transición estro-metaestro | 38 |
| Figura 3. | La localización nuclear del RE- α precede a la proliferación celular de los epitelios uterinos de la rata durante la transición estro-metaestro | 40 |
| Figura 4. | Localización celular de la proteína de c-Fos en los epitelios uterinos de la rata durante la transición estro-metaestro | 41 |
| Figura 5. | Cambios en la localización de ciclina D1 del citoplasma al núcleo de las células epiteliales del útero de la rata durante la transición estro-metaestro | 43 |
| Figura 6. | Ciclina D3 presenta una breve localización nuclear en los epitelios uterinos de la rata durante la transición estro-metaestro | 44 |
| Figura 7. | Localización nuclear permanente de Cdk-4 en los epitelios uterinos de la rata durante la transición estro-metaestro | 46 |
| Figura 8. | Localización celular de la proteína Cdk6 en los epitelios uterinos de la rata durante la transición estro-metaestro | 47 |
| Figura 9. | Representación esquemática de la secuencia de eventos que están involucrados en la inducción de la proliferación celular de los epitelios uterinos | 48 |
| Figura 10. | ICI 182,780 bloquea la proliferación de los epitelios uterinos inducida por E ₂ en ratones ovx | 51 |
| Figura 11. | ICI 182,780 bloquea la síntesis de ADN en los epitelios luminal y glandular de ratas ovx tratadas con E ₂ . | 52 |
| Figura 12. | Proliferación de los epitelios luminal y glandular de la rata después del tratamiento con ICI 182,780 en animales durante el ciclo estral. | 53 |
| Figura 13. | ICI 182,780 reduce el peso húmedo del útero en animales ovx tratados con E ₂ | 54 |
| Figura 14. | Efecto de ICI 182,780 sobre el peso húmedo del útero de ratas intactas durante el ciclo estral | 55 |
| Figura 15. | Inhibición de la expresión del RE- α inducida por el tratamiento con ICI 182,780 en el útero de animales ovx tratados con E ₂ y en animales intactos | 56 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| Figura 16. | La inhibición del RE- α inducida por el tratamiento con ICI 182,780 afecta la expresión del RP en el útero de ratas ovx tratadas con E ₂ pero no durante el ciclo estral | 58 |
| Figura 17. | Efecto de ICI 182,780 sobre la expresión de la proteína ciclina D1 en el útero de animales durante el ciclo estral | 59 |
| Figura 18. | ICI 182,780 induce la localización nuclear de ciclina D1 en el útero de ratas durante el ciclo estral | 60 |
| Figura 19. | El tratamiento con ICI 182,780 resulta en el incremento de la expresión de p-Gsk3 β en el útero de ratas durante el ciclo estral | 61 |
| Figura 20. | ICI 182,780 induce la localización nuclear de p-Gsk3- β en el útero de ratas durante el ciclo estral | 62 |
| Figura 21. | Cambios en la fosforilación de Akt en el útero de ratas durante el ciclo estral después del tratamiento con ICI 182,780 | 63 |
| Tabla 1 | Inmunotinción nuclear de las proteínas estudiadas en el epitelio luminal uterino durante la transición estro-metaestro | 48 |
| Tabla 2 | Inmunotinción nuclear de las proteínas estudiadas en el epitelio glandular uterino durante la transición estro-metaestro | 49 |
| Tabla 3 | Variaciones de los niveles de E ₂ y P ₄ en suero durante el ciclo estral de la rata | 50 |
| Tabla 4 | Concentración sérica de E ₂ y P ₄ en animales en metaestro | 64 |

Abreviaturas

| | |
|-------------------------------|--|
| ADN | Ácido desoxirribonucleico |
| ARN | Ácido ribonucleico |
| AF | Dominio de activación de la transcripción |
| AP-1 | Proteína activadora 1 |
| BrdU | 5-bromo-2' desoxi-uridina |
| Cdk4 | Cinasa 4 dependiente de ciclina |
| Cdk6 | Cinasa 6 dependiente de ciclina |
| CHX | Cicloheximida |
| CKI | Inhibidores de cinasas dependientes de ciclina |
| DAB | Diaminobencidina |
| DBD | Dominio de unión al ADN |
| E₂ | Estradiol |
| EGF | Factor de crecimiento epidermal |
| ERE | Elementos de respuesta a estrógenos |
| ERK 1/2 | Cinasas 1/2 reguladas por señales extracelulares |
| FSH | Hormona folículo estimulante |
| GAPDH | Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa |
| GnRH | Hormona liberadora de gonadotropinas |
| GPCR | Receptores acoplados a proteínas G |
| Gsk3β | Cinasa 3- β sintetasa de glucógeno |
| ICI | ICI 182,780 |
| IGF-I | Factor de crecimiento parecido a insulina |
| IL-2 | Interleucina 2 |
| LBD | Dominio de unión al ligando |
| LH | Hormona Luteinizante |
| LIF | Factor inhibitorio de leucemia |
| MAPK | Proteínas cinasas activadas por mitógenos |
| NGF-1 | Factor de crecimiento neuronal |
| Ovx | Ovariectomizadas |
| P₄ | Progesterona |
| PDGF | Factor de crecimiento derivado de plaquetas |
| PI3K | Fosfatidil-inositol-3-cinasa |
| PIP3 | Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato |
| PIP2 | Fosfatidilinositol-4,5-bifosfato |
| PKA | Proteína cinasa A |
| PKB | Proteína cinasa B |
| PKC | Proteína cinasa C |
| RA | Receptor de Andrógenos |
| RAR | Receptor de Acido Retinoico |
| RE | Receptor a Estrógenos |
| RE-α | Receptor a Estrógenos alfa |
| RE-β | Receptor a Estrógenos beta |
| RG | Receptor a Glucocorticoides |
| RM | Receptor a Mineralocorticoides |
| RN | Receptores Nucleares |
| RP | Receptor a Progesterona |
| RT | Receptor a Tirosina |
| RTK | Receptores a Tirosina cinasa |
| RVD | Receptor a Vitamina D |

| | |
|-------------|---|
| Ser | Serina |
| SERM | Moduladores selectivos del receptor a estrógenos |
| SERD | Down reguladores selectivos del receptor a estrógenos |
| SF-1 | Factor esteroideogénico 1 |
| SNC | Sistema Nervioso Central |
| TA | Temperatura ambiente |
| TGF | Factor de necrosis tumoral |
| Thr | Treonina |
| Tyr | Tirosina |
| TPA | 12-o-tetradecanoil-forbol-13-acetato |
| TRE | Elemento de respuesta a TPA |
| VEGF | Factor de crecimiento endotelial vascular |

Resumen

El principio de la reproducción establece que las hormonas esteroides regulan el proceso de proliferación celular del endometrio uterino, sin embargo, aún no se conoce cómo las hormonas esteroides regulan el crecimiento de los epitelios uterinos. En el presente estudio se determinó el inicio de la proliferación celular de los epitelios luminal y glandular del útero de la rata y su correlación con el patrón de expresión de las proteínas del receptor a estrógenos α (RE- α), c-Fos, ciclina D1, ciclina D3 y cinasas 4 y 6 dependientes de ciclinas (Cdk4 y Cdk6, respectivamente), como parte de la cascada de eventos que inducen la proliferación celular de los epitelios uterinos durante la transición estro-metaestro del ciclo estral. Por otra parte, una de las estrategias para estudiar los mecanismos moleculares involucrados en la proliferación celular inducida por los estrógenos, es el uso de antagonistas del RE, por lo que en este estudio se determinó el efecto del tratamiento con ICI 182, 780 (ICI), antagonista estrogénico, sobre la proliferación celular de los epitelios uterinos y la expresión tanto del RE- α como del receptor a progesterona A+B (RP) en el útero de ratas durante el ciclo estral y en ratas ovariectomizadas (ovx) tratadas con 17 β -estradiol (E₂). Además, en el útero de ratas intactas, se analizó el efecto del ICI sobre la expresión de proteínas reguladas por el E₂ como ciclina D1, Akt y cinasa 3- β sintetasa de glucógeno (Gsk3- β de glycogen synthase kinase 3- β).

Los resultados mostraron que el epitelio glandular comienza a proliferar entre las 21:00 h y 00:00 h del estro mientras que el epitelio luminal inicia su proliferación 3 h después. Durante la tarde del estro, se observó un incremento tanto en la localización nuclear de la proteína c-Fos como la del RE- α . De forma interesante, se detectó que las ciclinas, D1 y D3, se expresan de manera abundante en ambos epitelios uterinos, luminal y glandular, y su inmunotinción nuclear precede a la incorporación de 5-bromo-2'-desoxi-uridina (BrdU) en las células uterinas. Las proteínas Cdk4 y Cdk6 fueron localizadas en el núcleo de ambos epitelios durante todo el curso temporal estudiado. Además, la expresión de Cdk4 fue más abundante que la de Cdk6 durante los días del estro y metaestro. Los resultados de este estudio sugieren que hay una correlación positiva entre la expresión secuencial de estas proteínas y la progresión del ciclo celular en las células epiteliales uterinas durante el ciclo estral. Sin embargo, las diferencias observadas entre condiciones fisiológicas y farmacológicas en la localización celular, curso temporal de expresión y los tipos celulares que expresan ambas ciclinas (D1 y D3) sugieren diferentes mecanismos de regulación, posiblemente debido al complejo ambiente hormonal durante el ciclo estral.

En relación con el efecto del antagonista estrogénico, se observó que el tratamiento con ICI inhibió significativamente ($p < 0.01$) la expresión tanto del RE- α como la del RP en el útero de ratas ovx tratadas con E₂. Así mismo, la proliferación celular uterina fue bloqueada aproximadamente en un 70% en estos animales. Sin embargo, durante el ciclo estral, a pesar de que el ICI provocó una reducción del 90% en los niveles del RE- α , no tuvo efecto sobre la expresión del RP y solo inhibió un 15 % de la proliferación celular del epitelio luminal, no así la del epitelio glandular, sugiriendo la participación de otras vías de señalización adicionales a la del RE en la regulación de la proliferación del útero de la rata bajo condiciones fisiológicas. Además, el aumento observado tanto en la localización nuclear de la ciclina D1 como de la forma fosforilada de Gsk3 β en serina 9 (p-Gsk3- β Ser⁹) en los epitelios uterinos después del tratamiento con ICI sugiere que el efecto del E₂ sobre estas proteínas no involucra directamente la participación del RE- α , y que bajo condiciones fisiológicas, el tratamiento con ICI presenta tanto actividad agonista como antagonista sobre la expresión de proteínas reguladas por el E₂.

Abstract

It has been well recognized that steroid hormones regulate the endometrium proliferation. Nevertheless, the molecular mechanisms by which the steroid hormones regulate epithelial proliferation is still unknown. The aim of the present study was to evaluate the initiation of cellular proliferation of the luminal and glandular epithelium of the rat uterus and correlate them with the expression pattern of estrogen receptor α (ER- α), c-Fos, cyclin D1, cyclin D3, Cdk4 (cyclin dependent kinase 4) and Cdk6 (cyclin dependent kinase 6) proteins in order to establish the participation of these key molecules in the induction of uterine cell proliferation during the transition from estrus to metestrus of rat estrous cycle. On the other hand, we determine the effects of estrogenic antagonist ICI 182,780 (ICI) on the proliferative index of uterine epithelial cells, the expression of ER- α and progesterone receptor A+B (PRA+B) in the uterus of rats during estrous cycle and to evaluate the effects of ICI on the same parameters in ovariectomized (ovx) rats treated with 17 β -estradiol (E₂). In addition, we analysed cyclin D1, AKT and Gsk3- β (glycogen synthase kinase 3- β) proteins in the epithelium of intact rat uterus.

The results indicate that the glandular epithelium starts to proliferate at 21:00 h on estrus day, and initiates at least 3 h before the luminal epithelium does. Fos expression was markedly increased during the afternoon of estrus day, and its increase was in parallel to ER- α expression. Interestingly, both, cyclin D1 and D3 were abundantly expressed in the luminal and glandular epithelia, and nuclear immunolabelling of cyclin D1 and D3 precedes BrdU (5-bromo-2'-deoxyuridine) incorporation in the uterine cells. Cdk4 and Cdk6 were localized in the nuclei in both epithelia throughout the studied time course. In addition, Cdk4 was more abundant throughout estrus and metestrus days than Cdk6. In conclusion, there is a good correlation between sequential expression of these proteins and cell cycle progression in the rat uterine epithelial cells during the estrous cycle. However, the differences observed in the cellular localization, time course of expression and the cellular types that express both cyclins between physiological and pharmacological conditions, demonstrated different mechanisms of regulation and should be due to the complex hormonal milieu during the estrous cycle.

With regard to the effects of estrogenic antagonist, we observed that the administration of ICI significantly inhibits both ER- α and PR protein expression in ovx-E₂ treated rats. In addition, uterine cell proliferation was blocked in these animals. In contrast, during the estrous cycle, although ICI induced a marked reduction in ER- α concentrations, it was inefficient to inhibit PR expression and only reduced 15% of luminal epithelial cell proliferation, whereas it was completely ineffective at inhibiting glandular epithelial cell proliferation. In addition, the increase nuclear localization of cyclin D1 and phosphorylated Gsk3- β at serine 9 (p-Gsk3- β Ser⁹) after ICI treatment suggest that physiological E₂ effects on these proteins do not directly involve ER- α . Suggesting that there are different molecular mechanisms participating in physiological and pharmacological conditions that drive the regulation of cellular proliferation in the rat uterus.

Introducción

Los estrógenos han sido reconocidos como los reguladores primarios de la proliferación, diferenciación y función de diversos tejidos. El útero de los roedores ha servido como un valioso modelo para monitorear la sensibilidad de este tejido a la administración de hormonas esteroides ováricas.

El mecanismo mediante el cual los estrógenos inducen la replicación del ácido desoxirribonucleico (ADN) y la proliferación celular uterina ha sido ampliamente estudiado en animales ovariectomizados (ovx). En estos animales, de todos los tipos celulares que conforman el útero (epitelios, estroma y miometrio), solamente los epitelios luminal y glandular proliferan en respuesta al 17β -estradiol (E_2) (Clark, 1971; Kaye *et al.*, 1972; Marcus, 1974; Tong y Pollard, 1999; Zhuang *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2005; Zhu y Pollard, 2007), lo cual es inhibido por la administración de la progesterona (P_4) (Martin *et al.*, 1973; Kirkland *et al.*, 1979; Tong y Pollard, 1999). Se ha reportado que el mecanismo de acción de los estrógenos resulta de su interacción con el receptor de estrógenos (RE), el cual es un factor de transcripción ligando específico (Mendoza-Rodríguez *et al.*, 2001). El complejo RE-ligando interacciona con sitios de unión específicos del ADN que se llaman elementos de respuesta a estrógenos (ERE) y de esta manera modifica la expresión de múltiples genes involucrados en el proceso de proliferación celular, entre los cuales podemos citar al receptor de progesterona (RP) (Kraus y Katzenellenbogen, 1993; Savouret *et al.*, 1994), 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; Nephew *et al.*, 1993; Webb *et al.*, 1993), *c-myc* y *n-myc* (Murphy *et al.*, 1987; Travers y Knowler, 1987; Weisz y Bresciani, 1988), así como genes involucrados en el ciclo celular como ciclina D1, ciclina D3, ciclina E, ciclina A, cinasa 4 dependiente de ciclina (Cdk4 de *cyclin dependent kinase 4*) y cinasa 6 dependiente de ciclina (Cdk6 de *cyclin dependent kinase 6*) (Altucci *et al.*, 1997; Geum *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 1998; Zhuang *et al.*, 2001), entre otros.

En años recientes se han desarrollado diferentes compuestos con actividad antiestrogénica como el ICI 182,780 (ICI), también llamado fulvestrant o faslodex, el cual es un antagonista de los receptores a estrógenos α y β (RE- α y RE- β , respectivamente) (Howell *et al.*, 2000; Osborne *et al.*, 2004). En el útero de animales ovx, el tratamiento con ICI inhibe diversos efectos estrogénicos, como el incremento en la expresión de la proteína del RE- α (Branham *et al.*, 1996; Sahlin y Eriksson, 1996; Stygar *et al.*, 2003), la proliferación tanto del epitelio luminal como del glandular (O'Regan *et al.*, 1998; Gibson *et al.*, 1991; Stygar *et al.*, 2003; Zhu y Pollard, 2007), la expresión de los genes de ciclina D1 y D3 (Geum *et al.*, 1997), así como la activación de la vía de señalización de proteína cinasa b/AKT (Lengyel *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2005).

A pesar de que existe un gran número de estudios que demuestran que el ICI ejerce una acción antagonista sobre la proliferación celular endometrial y la expresión de proteínas reguladas por E₂, diversos autores reportan algunos efectos estrogénicos del ICI en modelos tanto *in vitro* como *in vivo*: a) En células MCF-7, el tratamiento con ICI induce 5% de los genes regulados a la alta por E₂ (Frasor *et al.*, 2004). b) En neuronas del cerebro de ratas neonatas induce un incremento significativo en la fosforilación de la cinasas 1/2 reguladas por señales extracelulares (ERK 1/2 de extracellular signal regulated kinase 1/2) (Wong *et al.*, 2003). c) En ovejas incrementa el peso del útero y los niveles del ácido ribonucleico mensajero (ARNm) de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH de glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) en el estroma y epitelio glandular uterino (Robertson *et al.*, 2001). d) Durante el ciclo estral de ovejas intactas induce la secreción de oxitocina y prostaglandina F_{2α} (al-Matubsi *et al.*, 1998). e) En el hígado de besugos incrementa el efecto del E₂ sobre los niveles de calcio plasmático y regula a la alta la expresión del RE-α (Pinto *et al.*, 2006). Lo anterior demuestra que el ICI tiene efectos agonistas y antagonistas sobre diversas respuestas estrogénicas en diferentes tejidos y modelos experimentales. Más aún, se ha observado que en los tejidos del tracto reproductivo la expresión de diversos genes es diferente en animales ovx comparado con animales intactos bajo condiciones fisiológicas como es el ciclo estral (Molnar y Murphy, 1994; Nandha *et al.*, 1999; Cameron *et al.*, 2002), por lo que la dinámica celular del útero durante el ciclo estral no puede ser mimetizada mediante el uso de modelos farmacológicos como ratas ovx tratadas con hormonas sexuales esteroideas exógenas.

El útero de la rata durante el ciclo estral representa un modelo adecuado para evaluar, en condiciones fisiológicas, la expresión de proteínas involucradas en el proceso de proliferación celular de este tejido, ya que los cambios cíclicos en los niveles de E₂ y P₄ inducen la proliferación de los epitelios uterinos durante el ciclo estral. En el presente estudio, el índice de proliferación celular de los epitelios uterinos (determinado por medio de la incorporación de BrdU al ADN) se correlacionó con el patrón de expresión de las proteínas del RE-α, c-Fos, ciclina D1, ciclina D3, Cdk4 y Cdk6 (determinadas por medio de inmunohistoquímica) durante la transición estro-metaestro del ciclo estral de la rata. Se comparó el efecto del tratamiento con ICI sobre el índice de incorporación de BrdU en las células de los epitelios uterinos, el peso húmedo del útero y la expresión uterina tanto del RE-α como del RP (determinadas por western blot) entre ratas durante el ciclo estral y ratas ovx tratadas con E₂. Además se analizó el efecto del ICI sobre la expresión y localización celular de Akt, Gsk3-β y ciclina D1 (determinadas por western blot e inmunohistoquímica) en el útero de ratas intactas.

Antecedentes

Ciclo estral de la rata

Generalidades

La rata es un mamífero no estacional y de ovulación cíclica. La ovulación ocurre durante todo el año y no depende de una estimulación externa, contrario a ciclos ovulatorios restringidos a una estación como en el caso de las ovejas o a la cópula como en el caso de las conejas (Beyer *et al.*, 1980). El ciclo reproductivo que presentan las ratas se conoce como ciclo estral, el cual está constituido por cuatro etapas: proestro, estro, metaestro y diestro. El tiempo de duración de un ciclo estral es de 4 o 5 días, período en el que se presentan cambios morfológicos en el tejido reproductivo y variaciones en las concentraciones plasmáticas de diferentes hormonas (Freeman, 1988; Westwood, 2008).

La forma más común para determinar la etapa del ciclo estral en la que se encuentra cada rata, es por medio del estudio de los cambios morfológicos en las células del epitelio vaginal. En un frotis vaginal se pueden observar diferentes tipos celulares: células epiteliales nucleadas, leucocitos polimorfonucleares y células epiteliales cornificadas (Figura i). El tipo celular predominante es el que nos indica la etapa del ciclo estral en la que se encuentra cada rata. 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, la cual se caracteriza por la presencia de células epiteliales cornificadas carentes de núcleo y de forma irregular (Figura iA). Durante el metaestro (también llamado diestro I) y el diestro (también llamado diestro II) predomina la presencia de leucocitos polimorfonucleares y la desaparición de las células epiteliales cornificadas (Figura iB y C). En el proestro, los leucocitos polimorfonucleares desaparecen y se observa un gran número de células epiteliales nucleadas las cuales son gradualmente reemplazadas por células epiteliales cornificadas (Figura iD) (Baker, 1979; Marcondes, 2002; Westwood, 2008).

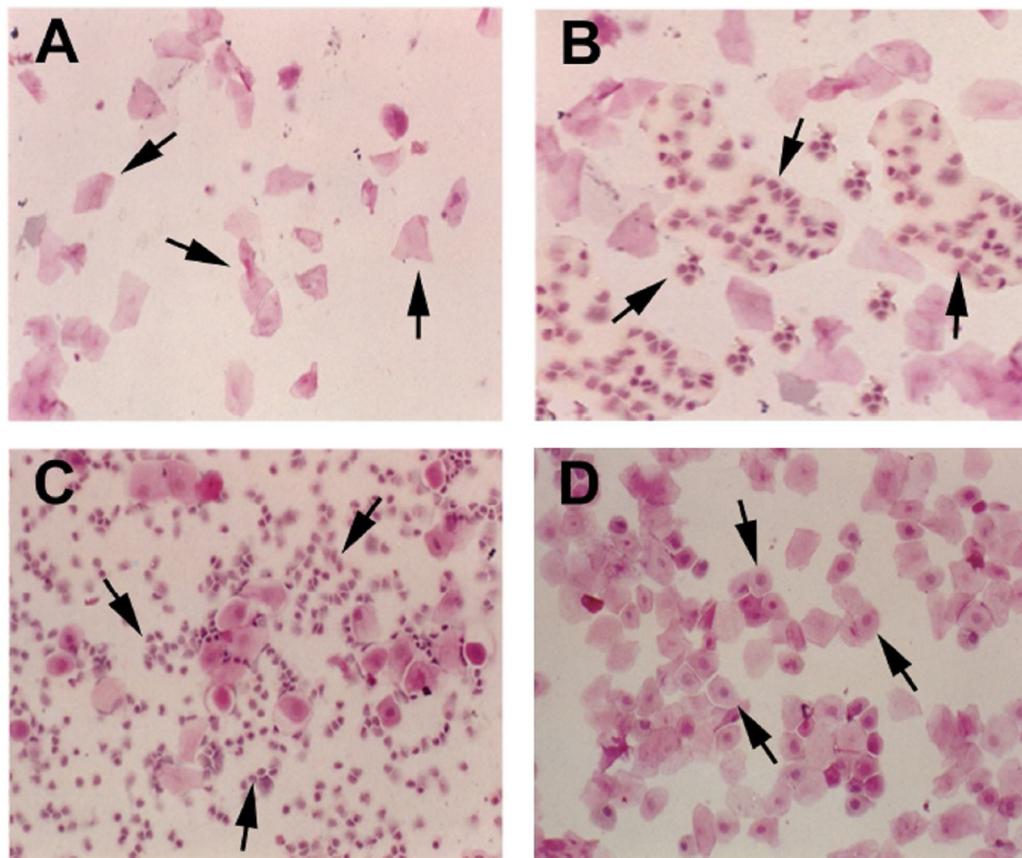


Figura i. Etapas del ciclo estral de la rata. Análisis citológico de frotis obtenidos de la pared vaginal de la rata. Las células fueron teñidas con hematoxilina y eosina para determinar la etapa del ciclo estral en el que se encuentra cada rata. (A) Estro, células epiteliales cornificadas; (B) Metaestro, leucocitos polimorfonucleares y células cornificadas; (C) Diestro, leucocitos polimorfonucleares y células epiteliales nucleadas; (D) Proestro, células epiteliales nucleadas. Las flechas indican el tipo celular predominante en cada etapa.

Niveles hormonales

En ratas que presentan un ciclo estral de cuatro días de duración, los niveles de E_2 en plasma periférico son basales (8 ± 2 pg/ml) durante el estro (Brown-Grant *et al.*, 1970; Butcher *et al.*, 1974; Freeman, 1988), posteriormente incrementan durante la tarde del metaestro y el diestro hasta llegar a su valor máximo (45 ± 2 pg/ml) a las 9:00 h del proestro (Butcher *et al.*, 1974) (Figura ii). Durante la tarde del proestro los niveles de E_2 disminuyen rápidamente y alcanzan valores basales en las primeras horas de la mañana del estro. El E_2 es secretado por las células de la teca interna y las células de la granulosa de los folículos de De Graaf que se encuentran en desarrollo.

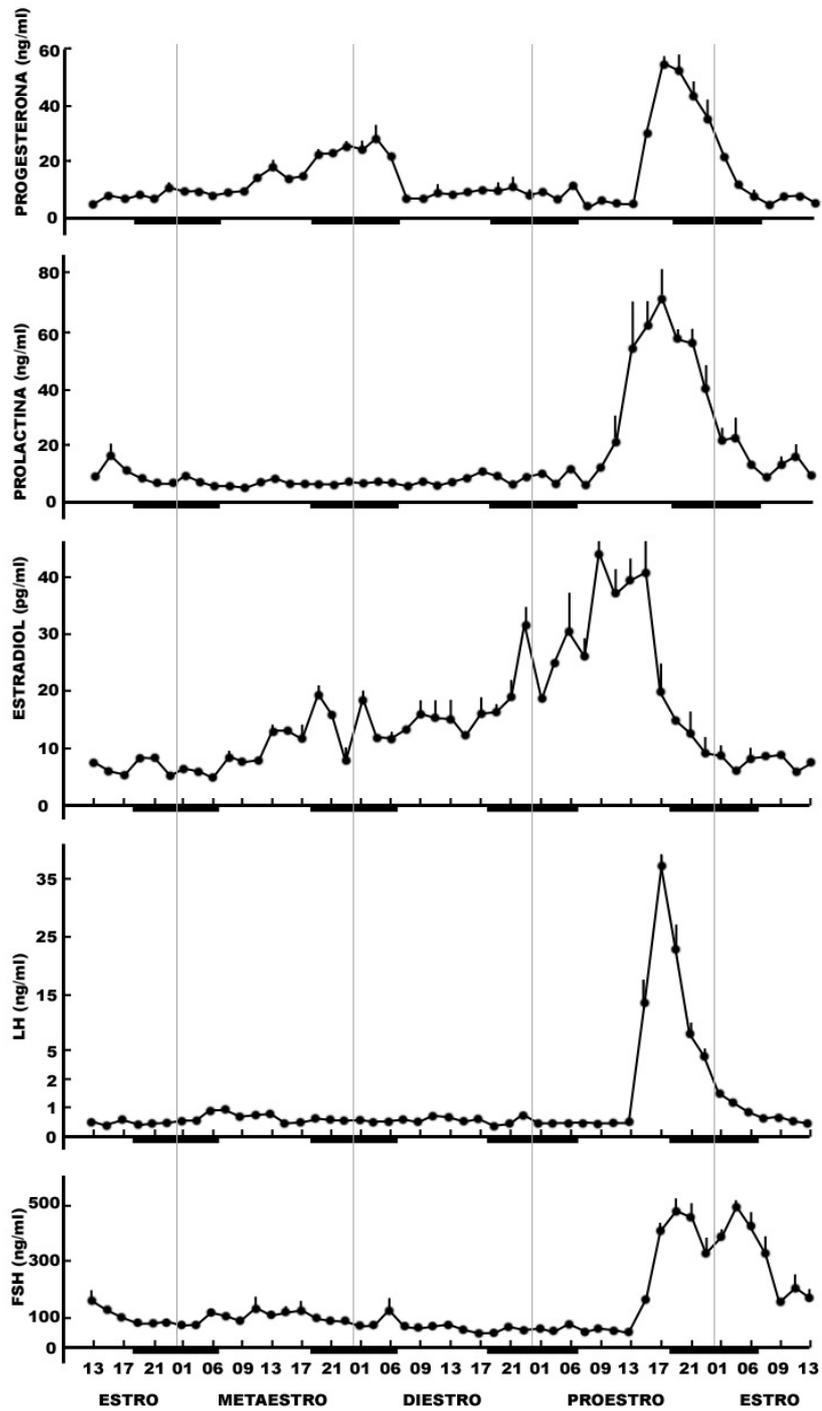


Figura ii. Concentraciones hormonales durante el ciclo estral. Concentración de progesterona, prolactina, estradiol, LH y FSH en plasma periférico obtenido en intervalos de 2 h a través de los 4 días del ciclo estral de la rata. Las barras negras representan los intervalos de oscuridad en la colonia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

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 14:00 y 15:00 h del proestro, y alcanzan su nivel máximo (37 ± 5 ng/ml) entre las 17:00 y 19:00 h de la misma etapa del ciclo estral (Figura ii) (Brown-Grant *et al.*, 1970; Butcher *et al.*, 1974; Freeman, 1988). El incremento en la concentración plasmática de LH induce la ruptura folicular y la ovulación en las primeras horas del estro. El nivel plasmático de LH comienza a disminuir en la noche del proestro hasta alcanzar niveles basales (0.5 ± 0.15 ng/ml) en las primeras horas de la mañana del estro y permanece así durante el metaestro y el diestro (Brown-Grant *et al.*, 1970; Butcher *et al.*, 1974; Freeman, 1988). El patrón de secreción de la hormona folículo estimulante (FSH) y el de prolactina durante el ciclo estral es similar al de LH.

Durante el ciclo estral se presentan dos incrementos en los niveles plasmáticos de P_4 (Figura ii). Un primer pico de P_4 (24 ± 3 ng/ml), secretada por el cuerpo lúteo, se observa alrededor del mediodía del metaestro y se mantiene hasta las primeras horas de la mañana del diestro, posteriormente la concentración de P_4 disminuye a niveles basales después de las 06:00 h del diestro. Durante la tarde del proestro se observa un segundo pico de P_4 , secretada por las células de la granulosa del folículo preovulatorio, el cual alcanza su valor máximo (46 ± 7 ng/ml) entre las 17:00 y 21:00 h. Este incremento sucede casi simultáneamente al incremento de LH. Los niveles de P_4 regresan a niveles basales (2 ± 1 ng/ml) en la mañana del estro (Butcher *et al.*, 1974; Freeman, 1988). El cambio en las concentraciones de estas hormonas durante el ciclo estral afecta la actividad del oviducto, útero, cervix y vagina, así como también algunos efectos fisiológicos generalizados (Westwood, 2008).

Cambios morfológicos del útero

El útero presenta cambios cíclicos dependientes de esteroides tanto en su estructura como en su función (Figura iii). Durante cada ciclo reproductivo, el útero inicialmente se prepara para recibir y transportar los espermatozoides 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 de músculo liso de la pared uterina, el cual está constituido por dos capas: una capa interna circular derivada de células mesénquimales ductales y una capa externa longitudinal derivada del mesénquima subperimetrial. Entre ambas capas se encuentra una capa de tejido conectivo que contiene nervios, vasos linfáticos y vasos sanguíneos. El endometrio es el revestimiento mucoso del útero y se

deriva de la capa externa del mesénquima ductal. Histológicamente, el endometrio esta conformado por dos tipos de células epiteliales: epitelio luminal y epitelio glandular, ambos se encuentran organizados en una matriz o estroma (Hafez, 1970; Gray *et al.*, 2001).

Durante el estro y el metaestro (fase lútea) las estructuras del endometrio están controladas por la P_4 producida por el cuerpo lúteo, ambos epitelios uterinos presentan muerte celular por apoptosis principalmente durante el estro, el endometrio se expande, el epitelio luminal se convierte a uno de tipo columnar alto, las glándulas crecen y secretan un fluido rico en glicoproteínas, azúcares y aminoácidos (Figura iiiA y B). Al final de la fase lútea, durante el diestro, el útero es pequeño, las glándulas son inactivas, el endometrio se reabsorbe y es reemplazado por una pequeña capa de estroma cubierta con tejido epitelial listo para entrar a un nuevo ciclo (Figura iiiC) (Hafez, 1970; Westwood, 2008).

Durante el proestro, el endometrio esta bajo la influencia de los estrógenos producidos por los folículos ováricos (fase folicular), el epitelio se convierte de un epitelio cuboidal a un epitelio columnar bajo, su vascularización incrementa, las glándulas presentan cierto crecimiento y el epitelio luminal comienza a extenderse como resultado de su actividad proliferativa (Figura iiiD). 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; Westwood, 2008).

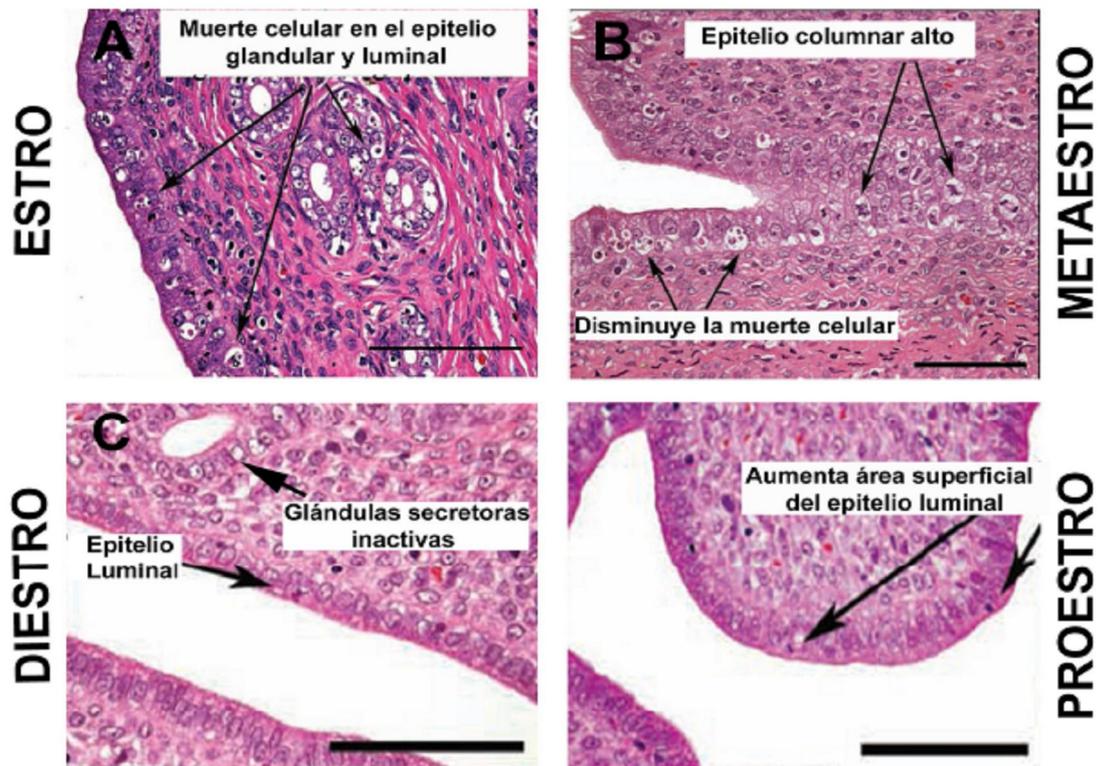


Figura iii. Cambios morfológicos del útero de la rata durante el ciclo estral. Corte transversal del útero de la rata en las diferentes etapas del ciclo estral teñido con hematoxilina y eosina. Barra= 100µm (Westwood, 2008 modificado).

Proliferación celular del útero

Uno de los principales efectos del E_2 sobre los diferentes tipos celulares del útero es la proliferación celular. Diversos reportes han descrito la proliferación celular del útero de la rata durante el ciclo estral por medio de la medición de la actividad mitótica uterina, sin embargo los resultados de diferentes grupos no coinciden perfectamente entre si. Marcus reportó que la actividad mitótica en el epitelio luminal es máxima durante la noche del diestro y la mañana del proestro, desciende rápidamente durante el estro y presenta una elevación secundaria durante el metaestro (Marcus, 1974). Este mismo estudio reportó que el epitelio glandular solamente prolifera durante el metaestro, mientras que Bertalanffy y Lau (1963) reportan que este tipo celular prolifera tanto en metaestro como en diestro. Por otro lado, estudios realizados en nuestro laboratorio, mostraron que las células del epitelio luminal proliferan durante el metaestro, diestro y proestro, mientras que el epitelio glandular prolifera durante los días del metaestro y diestro (Mendoza-Rodríguez *et al.*, 2003). Estos resultados concuerdan en parte con el estudio previo de Burroughs y col, en el cual la máxima proliferación celular en el epitelio luminal se observó durante el metaestro y el diestro, mientras que la proliferación celular del epitelio glandular fue

observada solamente durante el día del metaestro (Burroughs *et al.*, 2000). En el estroma endometrial, Marcus reportó que la mitosis ocurre en la tarde del diestro y en 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 (Marcus, 1974).

En las ratas inmaduras una sola dosis de E₂ (50 ng/rata) induce la proliferación de todos los tejidos uterinos: epitelios, estroma y miometrio (Kaye *et al.*, 1972; Kirkland *et al.*, 1979; Quarmby y Korach, 1984). El índice mitótico en el epitelio luminal alcanza su máximo valor 24 h después del tratamiento (Kaye *et al.*, 1972; Kirkland *et al.*, 1979). En el estroma y miometrio el máximo índice mitótico se observa hacia las 24 h (Kaye *et al.*, 1972) y 36-48 h (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 ovx solamente se presenta si la rata ha sido pretratada con P₄. Las ratas adultas ovariectomizadas que han sido tratadas con E₂ (0.2 µg/rata) solo presentan mitosis en los epitelios luminal y glandular, pero no en el estroma. En el epitelio luminal el índice mitótico empieza a aumentar 12 h después del tratamiento con E₂, alcanza su máximo valor a las 24 h y regresa a niveles basales a las 36 h. En el epitelio glandular el índice mitótico empieza a aumentar a las 12 h y presenta el máximo valor a las 48 h, regresando a niveles basales 72 h después del tratamiento con E₂ (Tachi *et al.*, 1972). En ratas ovx que han sido tratadas con dipropionato de E₂ el índice mitótico en el epitelio luminal empieza a aumentar a las 36 h y alcanza su máximo valor a las 48 h. En el epitelio glandular el índice mitótico presenta el máximo valor a las 48 h después del tratamiento hormonal (Gunin, 1997). El pretratamiento con P₄ suprime la acción mitogénica del E₂ tanto en el epitelio luminal como en el glandular y causa una respuesta mitótica en el estroma en respuesta al E₂. El estroma comienza a proliferar 6 h después del cotratamiento con P₄ (2 mg diarios por 3 días) + E₂ (0.6 µg/rata), se presenta el máximo índice mitótico a las 12 h y regresa a niveles basales a las 24 h (Rider *et al.*, 2003). La P₄ sola no produce mitosis en ninguno de los tejidos (Clark, 1971; Tachi *et al.*, 1972; Rider *et al.*, 2003).

Receptores a estrógenos y progesterona

Los receptores a E₂ y P₄ son miembros de la superfamilia de receptores nucleares (RN). Esta superfamilia se ha organizado en tres grupos. El grupo I incluye los receptores a hormonas esteroides dentro de los cuales se encuentran el RE- α , el RE- β , el RP, el receptor a glucocorticoides (RG), el receptor a mineralocorticoides (RM) y el receptor a andrógenos (RA). En el grupo II se encuentran los receptores de ácido retinoico (RAR $\alpha/\beta/\gamma$), el receptor a vitamina D (RVD) y el receptor a tirosina (RT α/β). El grupo III incluye a los receptores llamados huérfanos, debido a que no se conocen sus ligandos, como el factor 1 esteroideogénico (SF-1 de Steroidogenic Factor 1) y el receptor inducido por el factor de crecimiento nervioso (NGFI de Nerve Growth Factor-Induced) (Tsai y O'Malley, 1994; Ellmann *et al.*, 2009).

El E_2 y la P_4 son hormonas esteroideas derivadas del colesterol que regulan diversos procesos biológicos como la reproducción, la diferenciación, la proliferación celular, el crecimiento, el desarrollo, la apoptosis, el metabolismo, la homeostasis, entre otros (Tsai y O'Malley, 1994; Edwards, 2005). La síntesis de E_2 se lleva a cabo en el retículo endoplasmático liso de las células de la granulosa del ovario (Gore-Langton y Armstrong, 1988), en células de Sertoli y en el cerebro (Calixto y Brailowsky, 1999), mientras que la P_4 se sintetiza principalmente en el retículo endoplasmático liso de las células del cuerpo lúteo del ovario (Hsueh *et al.*, 1984; Hutchison *et al.*, 1986), corteza adrenal, placenta (Perrot-Aplanat y David-Ferreira, 1982; Pomata *et al.*, 2000), testículo (Weisz y Ward, 1980; Dalkin *et al.*, 1992) y cerebro (Ukena *et al.*, 1999; Zwain y Yen, 1999). La síntesis de ambas hormonas es regulada por diversas hormonas como la LH, FSH, prostanglandinas y adrenalina (Graham y Clarke, 1997).

Los efectos biológicos del E_2 son mediados a través de su interacción específica con uno de los dos subtipos del RE, RE- α y RE- β , mientras que la P_4 lo hace a través de su interacción con una de las dos isoformas del RP, RP-A y RP-B. Tanto el RE como el RP funcionan como factores de transcripción activados por ligando (Edwards, 2005; Ellmann *et al.*, 2009). El RE- α y el RE- β son productos de diferentes genes, ESR1 y ESR2 respectivamente, localizados en diferentes cromosomas. La proteína codificada por el gen ESR1, localizado en el cromosoma 6 (6q24.5), esta constituida por 599 aminoácidos con una masa molecular de 66 kDa, mientras que el gen ESR2 esta localizado en el cromosoma 14 (14q23.2) y codifica a una proteína constituida por 549 aminoácidos con una masa molecular de 61 kDa. La diferencia en tamaño entre ambos receptores a estrógenos se debe a que el RE- β tiene una región amino terminal más corta que el RE- α (Matthews y Gustafsson, 2003; Ellmann *et al.*, 2009).

Los receptores a estrógenos se encuentran ampliamente distribuidos en el organismo. El RE- α se expresa en forma primaria en útero, glándula mamaria, riñón, hígado y corazón mientras que el RE- β en ovario, próstata, pulmón y sistema nervioso central (SNC). Ambos receptores se coexpresan en un gran número de tejidos como glándula mamaria, tiroides, hueso, epidídimo, entre otros (Kuiper *et al.*, 1996; Kuiper y Gustafsson, 1997; Diel, 2002; Matthews y Gustafsson, 2003). Se ha sugerido que el RE- α es el subtipo dominante en el útero de la rata (Buchanan *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 1999; Mendoza-Rodríguez *et al.*, 2003).

La actividad del RE- α es regulada en el útero y en el oviducto por cambios cíclicos en los niveles hormonales. En ratas inmaduras ovx, los niveles del RE- α disminuyen 24 h después del tratamiento con E_2 , manteniendo niveles bajos de expresión hasta 6 días después del tratamiento hormonal (Kraus y Katzenellenbogen, 1993). El E_2 y la P_4 administrados a ratas adultas ovx tienen efectos tanto inductores

como represores sobre la expresión del RE- α en los epitelios y estroma del útero de la rata. Se ha demostrado que el E₂ en estos animales regula (primero inhibiendo y después induciendo) los niveles del ARNm y de la proteína del RE- α . Tanto el ARNm como la proteína del RE- α disminuyen 6 h después de la administración de E₂ en las células de los epitelios uterinos. Sin embargo, 24 h después del tratamiento con E₂, 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 (Sahlin y Eriksson, 1996; Nephew *et al.*, 2000; Stygar *et al.*, 2003). El tratamiento con P₄ también reduce la expresión del RE- α en el epitelio luminal de ratas ovx pretratadas con E₂ (Wang *et al.*, 1999). En el útero de la rata durante el ciclo estral se ha demostrado que el RE- α presenta los niveles más bajos de expresión durante los días del proestro y estro, cuando las concentraciones de E₂ y P₄ son las más altas del ciclo. En cambio, la expresión del RE- β no fue detectada en ambos epitelios uterinos durante todo el ciclo estral (Mendoza-Rodríguez *et al.*, 2003), sustentando la idea de que el RE- α es el subtipo dominante en los epitelios uterinos.

Las isoformas del RP (RP-A y RP-B) son productos de un mismo gen localizado en el cromosoma 11 (11q22.1). Estas isoformas difieren sólo en que el RP-B contiene una extensión adicional amino terminal de aproximadamente 165 aminoácidos resultando en una proteína de una masa molecular de 116 kDa, mientras que la proteína del RP-A tiene una masa molecular de 94 kDa (Kraus *et al.*, 1993; Edwards, 2005; Ellmann, 2009). El RP se expresa en diversos tejidos del aparato reproductivo como las células de la granulosa del ovario, tubas uterinas, útero, vagina, testículo y glándula mamaria (Conneely *et al.*, 2002), así como en otros tejidos no reproductivos como timo, pulmón, tejido óseo y en diversas áreas del SNC (Guerra-Araiza y Camacho-Arroyo, 2000). En el útero, la expresión del RP es regulada por cambios cíclicos en los niveles hormonales. En el útero de animales ovx se ha demostrado que el tratamiento con E₂ induce un incremento tanto en los niveles del ARNm como de la proteína del RP 24 h después del tratamiento hormonal. Los niveles de la proteína del RP continúan incrementando hasta el sexto día del tratamiento, mientras que los niveles del ARNm disminuyen (Kraus y Katzenellenbogen, 1993). El tratamiento con P₄ reduce la expresión y la intensidad de la inmunotinción para el RP en el útero de ratas ovx (Ohta *et al.*, 1993). En el útero de ratas intactas se ha demostrado que la expresión del RP aumenta en el día del diestro, mientras que en el estro y metaestro disminuye (Ohta *et al.*, 1993; Ramos *et al.*, 2002).

Estructura de los receptores a estrógenos y progesterona

Los receptores a hormonas esteroideas están compuestos de seis dominios funcionales (Figura iv). En la región amino terminal de ambos receptores se encuentran los dominios A/B que contienen la función de activación 1 (AF-1) independiente de ligando. Para el caso del RP-B existe otro dominio de activación de la transcripción conocido como función de activación 3 (AF-3) o BUS (de B-upstream

segment) (Giangrande *et al.*, 1997; Ellmann, 2009). En la región central, se encuentra el dominio C o dominio de unión al ADN (DBD de DNA binding domain), cuya estructura se compone por dos dedos de zinc los cuales juegan un papel importante en la dimerización del receptor y la unión de los mismos a secuencias específicas del ADN. Los dímeros del RE- α y del RE- β se unen a los elementos de respuesta a estrógenos (ERE) y regulan un set similar de genes (Klinge, 2001) mientras que el RP reconoce una secuencia de ADN denominada elemento de respuesta a progesterona (ERP). El dominio D o también conocido como región de bisagra, es una región rica en aminoácidos básicos (arginina y lisina) que contiene la señal de localización nuclear. En la región carboxilo terminal se encuentran los dominios E/F que contienen el dominio de unión al ligando (LBD de Ligand binding domain), la función de activación 2 (AF-2) dependiente de ligando y una región de dimerización (Couse y Korach, 1999; Matthews y Gustafsson, 2003; Edwards, 2005; Heldring, 2007). Ambos receptores de estrógenos presentan un alto grado de homología en su secuencia en el dominio C (96%), mientras que el dominio menos conservado entre los dos RE es el A/B (17%) (Couse y Korach, 1999; Edwards, 2005) (Figura iv).

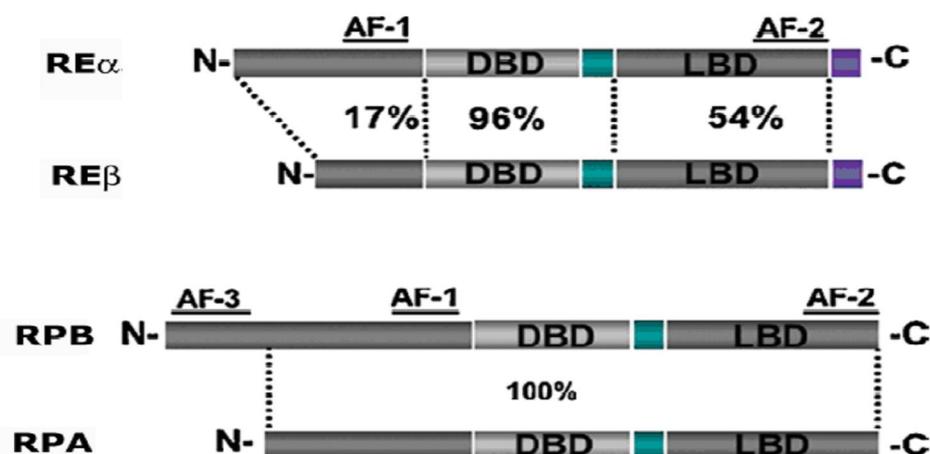


Figura iv. Estructura de los receptores a estrógenos y progesterona. En el diagrama se muestra la organización de los diferentes dominios que conforman a cada receptor. Se muestra el LBD, Dominio de unión al ligando; DBD, Dominio de unión al ADN; AF, Dominio de activación de la transcripción (AF-1, AF-2, AF-3). Los porcentajes indican la homología en la secuencia de aminoácidos entre los dominios del RE- α y RE- β y entre las isoformas A y B del RP (Edwards, 2005 modificado).

Mecanismo de acción del receptor a estrógenos

Los mecanismos moleculares mediante los cuales el E₂ puede llevar a cabo sus efectos se dividen en dos: genómico y no genómico. El primero involucra la unión de los REs a su secuencia blanco en el ADN o su interacción con otras proteínas para alterar la actividad génica. Este tipo de mecanismo ocurre

de manera lenta, de modo que el proceso se lleva a cabo en horas o incluso en días (Hall *et al.*, 2001; Nilsson *et al.*, 2001; Edwards, 2005; Cheskis *et al.*, 2007). El segundo es el mecanismo no genómico el cual ocurre de manera rápida en el orden de segundos a minutos y es mediado por REs extranucleares ó por receptores no clásicos unidos a la membrana celular los cuales permiten la activación de diferentes vías de señalización, tales como la vía de proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK de mitogen-activated protein kinase), la vía de fosfatidilinositol-3-cinasa (PI3K de phosphatidylinositol 3-kinase)/AKT, de proteína cinasa C (PKC de protein kinase C), entre otras (Edwards, 2005; Cheskis *et al.*, 2007; Fu y Simoncini, 2008; Levin, 2008).

El mecanismo genómico consiste en la activación del receptor por la unión de la hormona induciendo un cambio conformacional en la estructura del receptor, su disociación de las proteínas de choque térmico y su posterior dimerización e interacción con los ERE en el ADN. Estos ERE 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 los estrógenos. Por otra parte, se ha demostrado que el complejo hormona-RE también puede interactuar con factores de transcripción como AP-1 y SP-1 para promover la transcripción de genes cuyo promotor no contiene ERE (Couse y Korach, 1999; Hall *et al.*, 2001; Nilsson *et al.*, 2001).

Se ha demostrado que después de que el receptor activado interacciona con el ADN, los receptores son capaces de reclutar diversas proteínas correguladoras. A la fecha se han identificado alrededor de 300 diferentes proteínas correguladoras que están involucradas en la activación de la transcripción de genes regulados por receptores nucleares (Mckenna *et al.*, 1999; Ellmann, 2009). Muchas de estas proteínas son coactivadores bifuncionales ya que no sólo contribuyen a activar la transcripción de genes sino que además, tienen una actividad enzimática, que a su vez modifica la transcripción. 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 la transcripción basal facilitando la entrada subsecuente de diferentes complejos, lo que prepara 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. En la actualidad se considera que la hiperacetilación de los 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). Además la acetilación de los residuos de lisina de los extremos amino terminales de las histonas altera la estructura de la cromatina (Rhodes, 1997). Algunos cofactores que presentan la actividad enzimática de acetiltransferasa son: la familia de proteínas p160/SRC

(p160/Steroid Receptor Coactivator), p300/CBP (p300/ CREB binding protein) y PCAF/GCN5. Otros coactivadores que alteran la estructura del nucleosoma son aquellos que tienen actividad intrínseca de ATPasa como los productos de los genes *brm* (brahma) y *brg-1* (brahma-related gene 1) (McKenna *et al.*, 1999). Todos estos coactivadores producen alteraciones en el nucleosoma, en la región del enhancer/promotor, estableciendo un vínculo directo con los factores generales de la transcripción y la ARN polimerasa II, lo cual resulta en la estabilización del complejo de preiniciación y la activación de la transcripción (McKenna y O'Malley, 2000).

Regulación de la expresión de proto-oncogenes por hormonas esteroideas

Los proto-oncogenes son genes celulares que al sufrir mutaciones pueden transformarse en oncogenes activos. Los proto-oncogenes se clasifican funcionalmente en tres grandes categorías: a) factores de crecimiento y sus receptores; b) mediadores de las vías de la transducción de señales intracelulares y c) factores de transcripción (Bishop, 1987). La interacción y cooperación entre los productos de las diferentes clases de proto-oncogenes juega un papel muy importante durante la proliferación, crecimiento, diferenciación y desarrollo celular.

La expresión de los proto-oncogenes (como *c-fos*, *c-jun*, *jun B*, *jun D*, entre otros) es inducida en respuesta a una gran variedad de agentes y estímulos, 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 (Ransone y Verma, 1990). Su inducción es rápida y pasajera y ocurre a nivel de transcripción, por lo que también son conocidos como genes de expresión temprana. Diversos autores han reportado el efecto modulador de los estrógenos sobre la expresión de proto-oncogenes. Se ha demostrado que en el útero de ratas ovx el E₂ induce la proliferación de los epitelios luminal y glandular por medio de la expresión, en forma primaria y rápida, de factores de transcripción, los cuales incluyen diversos proto-oncogenes como son *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). En el caso de *c-fos*, *c-jun* y *jun-D*, la concentración del ARNm de estos genes empieza a incrementarse, en el útero de la rata, 15 a 60 min después de la administración de E₂ y *jun-B* empieza a aumentar 60 a 90 min después de la administración de la hormona (Murphy *et al.*, 1987; Weisz y Bresciani, 1988).

Por hibridación *in situ*, se ha podido detectar en qué tipo celular del útero se presenta este aumento en la expresión de los diferentes proto-oncogenes. En el útero de ratas ovx tratadas con E₂ se incrementan los niveles del ARNm de *c-fos*, *jun-B* y *jun-D* en las células de los epitelios luminal y glandular. En el

caso del gen de *jun-D* también se observa un ligero incremento en su expresión en el miometrio (Nephew *et al.*, 1994; Nephew *et al.*, 1995). Estos incrementos son aún notorios 12 h después de la administración de la hormona y regresan a niveles basales a las 24 h. 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 h de tratamiento con E₂, el ARNm de *c-jun* prácticamente desaparece del epitelio luminal y presenta un incremento importante en miometrio (Nephew *et al.*, 1994). Este incremento en los niveles del ARNm de los proto-oncogenes *c-fos*, *c-jun*, *jun-B* y *jun-D* por E₂ es bloqueado por actinomicina D (inhibidor de la transcripción), pero no por puomicina o cicloheximida (inhibidores de la síntesis de proteínas) (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 E₂ sobre la expresión de estos proto-oncogenes ocurren a nivel transcripcional. El aumento en los niveles del ARNm de los proto-oncogenes se traduce en un incremento en la proteína de éstos; se ha observado que las proteínas c-Fos y Jun-B se incrementan 2-3 h después de la administración de E₂ en las células de los epitelios luminal y glandular (Papa *et al.*, 1991; Webb *et al.*, 1993).

La P₄ inhibe la proliferación celular inducida por E₂ y causa la diferenciación del endometrio a uno de tipo secretor. Diversos autores han reportado que el tratamiento con P₄ reduce los niveles del ARNm de *c-fos* inducido por el E₂ y bloquea el efecto represivo del E₂ sobre la expresión de *c-jun* en el tejido epitelial (Kirkland *et al.*, 1992; Bigsby y Li, 1994). El cotratamiento con E₂ + P₄ no altera la expresión de *jun-B* observada en el útero de las ratas tratadas solamente con E₂, lo que sugiere que uno de los mecanismos mediante el cual la P₄ inhibe la proliferación celular de los epitelios uterinos inducida por E₂ es a través de la supresión de la transcripción de *c-fos* y la inducción de *c-jun* en el epitelio uterino (Kirkland *et al.*, 1992, Bigsby y Li, 1994). Los datos descritos anteriormente han sido determinados en el modelo farmacológico de ratas ovx tratadas con E₂.

Durante el ciclo estral de la rata, por hibridación *in situ* se detectó que el mayor contenido del ARNm de *c-fos* en los epitelios luminal y glandular del útero se observa en el día del metaestro. En el caso de *c-jun* detectaron que el contenido de ARNm se mantiene constante y se expresa en bajos niveles en el útero durante todos los días del ciclo estral. Los niveles de expresión nuclear de la proteína c-Fos se mantienen elevados durante los días del metaestro y diestro tanto en el epitelio luminal como en el glandular (Mendoza-Rodríguez *et al.*, 2003).

La regulación del E₂ en la expresión de proto-oncogenes nucleares es tejido-específica. Se ha determinado que la expresión de estos proto-oncogenes no es inducida por E₂ en pulmón, riñón, hígado,

músculo, bazo, corazón e intestino grueso (Murphy *et al.*, 1987; Weisz y Bresciani, 1988, Weisz *et al.*, 1990), pero si en el útero de animales ovx. Así mismo, se ha observado que estos efectos también son hormona específicos, ya que mientras que el E₂ induce la expresión de estos proto-oncogenes en útero de ratas ovx, otras hormonas como glucocorticoides, andrógenos o P₄ no inducen la expresión de estos genes (Loose-Mitchell *et al.*, 1988; Nephew *et al.*, 1993; Webb *et al.*, 1993; Nephew *et al.*, 1995).

Función de AP-1 en la proliferación celular

AP-1 (proteína activadora-1) es un factor de transcripción que regula la expresión de genes vinculados con diferentes procesos celulares como proliferación, apoptosis, invasión y angiogénesis, entre otros (Shaulian *et al.*, 2001; Eferl *et al.*, 2003). Se sabe que las proteínas de la familia de Jun (c-Jun, Jun B y Jun D) pueden formar homodímeros así como heterodímeros con las proteínas de la familia de Fos (c-Fos, Fos B, Fra 1 y Fra 2), mientras que las proteínas de la familia de Fos no son capaces de asociarse entre sí pero pueden formar heterodímeros con las proteínas de la familia de Jun. Los diferentes complejos que se forman reciben el nombre de AP-1. Estos complejos AP-1 se unen principalmente a regiones promotoras que contienen el elemento de respuesta a TPA (12-o-tetradecanoil-forbol-13-acetato) llamado TRE (de TPA response element) y el elemento de respuesta a AMPc llamado CRE (de cAMP response element), cuyas secuencias consenso son 5'-TGAGTCA-3' y 5'-TGACGTCA-3', respectivamente.

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, factor de crecimiento epidermal (EGF de Epidermal growth factor), factor α de crecimiento tumoral (TGF α de Tumor growth factor α), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF de Platelet-derived growth factor), estrógenos, entre otros (Weisz y Bresciani, 1988; Quantin y Breathnach, 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 (Miller *et al.*, 1989; Schüte *et al.*, 1989). 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 (Holt *et al.*, 1986; Riabowol *et al.*, 1988). Estos experimentos indican que el complejo AP-1 es un blanco nuclear para la 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 como interleucina 2 (IL-2), TGF α , y TGF β (Kim *et al.*, 1990; Muegge *et al.*, 1989). A pesar de que estos genes modifican la proliferación celular, no explican cómo los complejos AP-1 regulan la replicación del ADN después de un estímulo mitogénico.

Uno de los múltiples factores de transcripción que regulan el gen de ciclina D1 es AP-1. Dos sitios AP-1 (5'-TGAGTCA-3' Y 5'-TAACGTCA-3') han sido identificados en la región promotora del gen humano de la ciclina D1 (*Cyc D1*) (Herber *et al.*, 1994; Albanese *et al.*, 1995; Pestell *et al.*, 1999; Shen *et al.*, 2007; Klein y Assoian, 2008). Así mismo, se ha reportado que varias proteínas AP-1 se unen a estos sitios, incluyendo c-Jun, JunB, c-Fos y ATF, y regulan la transcripción de *Cyc D1* (Brown *et al.*, 1998; Beier *et al.*, 1999; Wisdom *et al.*, 1999; Bakiri *et al.*, 2000). Estas secuencias regulatorias han sido propuestas como el mecanismo mediante el cual el E₂ induce la replicación del ADN y la proliferación celular en el útero de ratas ovx debido a que estos pueden inducir a las ciclinas que participan en la transición de la fase G1 a S del ciclo celular. La región promotora de las ciclinas D1 y D3 en roedores tiene secuencias regulatorias parecidas a AP-1 cuya secuencia consenso es 5'-TGTCTCA-3' (Kitazawa *et al.*, 1999; Eto, 2000; Klein y Assoian, 2008).

Ciclo celular

La capacidad de una célula para reproducirse es quizás la propiedad fundamental de la vida. Para que las células puedan proliferar, tres eventos deben ocurrir: la masa celular debe aumentar, el material genético debe ser duplicado y el proceso de división celular debe ocurrir, asegurando que cada célula hija reciba un complemento genético igual e idéntico para asegurar la perpetuación de la estirpe celular. En los organismos la ocurrencia de estos eventos de manera coordinada está dada por el proceso conocido como ciclo celular. El ciclo celular se ha dividido en dos fases: interfase y mitosis, donde la primera comprende las fases G1, S y G2, y la segunda se divide en profase, metafase, anafase, telofase y citocinesis. Durante la fase de G1 (de gap o espacio), las células perciben las condiciones medio-ambientales y comienzan una etapa de crecimiento celular; posteriormente, si el entorno es adecuado para la proliferación celular las células entran a la fase S (de síntesis), en la cual el ADN se duplicará; posteriormente, en la fase G2 (gap 2), se asegurará que el ADN ha sido correctamente duplicado para que éste se pueda repartir. Finalmente, durante la mitosis, los cromosomas duplicados son compactados y alineados en el plano de metafase, y cada copia de los cromosomas será movilizad hacia extremos opuestos de la célula, lo que permitirá la formación de dos nuevas células cada una con idéntica información genética. Si las condiciones celulares

son óptimas, estas células entrarán de nuevo a la fase G1 para dar inicio a un nuevo ciclo celular y de esta manera promover la proliferación celular.

Regulación de la fase G1 del ciclo celular por estrógenos

La estimulación de la proliferación celular requiere de la activación inicial de un complejo ciclina-Cdk. En los mamíferos, la progresión de la fase G1 del ciclo celular es regulada por tres ciclinas tipo D (D1, D2 y D3), las cuales se unen a subunidades catalíticas específicas llamadas Cdk4 y Cdk6. Estos complejos son importantes no solo porque le dan inicio y dirección al ciclo, si no porque también funcionan en el acoplamiento del ciclo con las condiciones del medio ambiente que determinan la iniciación de los eventos moleculares que dan inicio a la proliferación celular. La actividad de cinasa de estos complejos es altamente regulada por estímulos intracelulares y extracelulares, como son la presencia de hormonas y factores de crecimiento, entre otros (Hunter y Pines, 1994; Sherr, 1994; Altucci *et al.*, 1997; Mullany *et al.*, 2008), todas las cuales promueven la transducción de señales que finalmente activan al complejo con actividad de cinasa. Este complejo será inhibido por proteínas específicas en G1 si las condiciones del medio ambiente no son propicias para iniciar los eventos del ciclo celular. La función más relevante de los complejos ciclinas tipo D-Cdk es fosforilar a los miembros de la familia de proteínas de retinoblastoma (pRb, p107 y p130), lo que resulta en su inactivación, permitiendo la liberación del factor transcripcional conformado por las proteínas E2F (E2F 1-8)/DP y por ende la transcripción de genes necesarios para que continúe el ciclo celular como ciclina E, ciclina A, cdc2, y Cdk2 (Dalton, 1992; Furukawa *et al.*, 1994; Ohtani *et al.*, 1995; Schulze *et al.*, 1995; Tommasi y Pfeifer, 1995; Botz *et al.*, 1996; Geng *et al.*, 1996; Huet *et al.*, 1996). La actividad del complejo ciclina D-Cdk4 es regulada por 2 familias de inhibidores de cinasa dependientes de ciclina (CKI): proteínas inhibidoras de Cdk4 (Ink4 de inhibitor of Cdk4) (p16, p15, p18 y p19) que disminuyen la actividad de Cdk4 y Cdk6 durante la fase G1 y los denominados Cip/Kip (de Cdk interacting protein ó kinase inhibitor protein) (p21, p27 y p57) que tienen como blanco a los complejos ciclina D-Cdk4 ó ciclina E-Cdk2 (Polyak *et al.*, 1994; Toyoshima y Hunter, 1994; Chen *et al.*, 1995, LaBaer *et al.*, 1997).

Diversos estudios han demostrado los efectos del E₂ sobre la expresión y actividad de ciclinas y Cdks en el útero de ratas ovx. Los resultados indican que el tratamiento con E₂ induce la activación de varias Cdks como la 4, 5 y 6, no así la Cdk2, acompañada de un incremento en la expresión del ARNm de las ciclinas D1, D3, A y E. Análisis de extractos de ARN del endometrio de ratas tratadas con E₂ muestran una acumulación temprana del ARNm de ciclinas D1 y D3, pero no de ciclina D2, que se presenta después de la acumulación transitoria del ARNm de *c-fos* (Altucci *et al.*, 1997). Por otra parte, se ha reportado que en el modelo farmacológico de ratones inmaduros, la administración de E₂ induce los ARNm de ciclinas

D1 y D3 2.5 veces respecto a los animales no tratados, y esta inducción se presenta después del pico de ARNm de *c-fos* y antes del pico de ARNm de timidina cinasa. La expresión de los genes de ciclinas D1 y D3 inducida por el E₂ es bloqueada por el tratamiento con antiestrógenos, como tamoxifeno e ICI 182,780. La administración de cicloheximida (CHX) a animales primados con E₂ produce una superinducibilidad del ARNm de ciclina D3 pero no de ciclina D1. Estos resultados sugieren que los ARNm de ciclinas D1 y D3 son expresados constitutivamente en el tejido uterino y se inducen por E₂ en la fase G1 del ciclo celular uterino de los ratones. Sin embargo, la superinducibilidad y el cambio temporal de ciclina D3 por CHX sugieren un mecanismo regulatorio diferencial de la expresión de los genes de ciclinas D1 y D3 en la progresión del ciclo celular uterino de los ratones (Geum *et al.*, 1997). De forma interesante, un estudio previo indica que el tratamiento con E₂ a ratas ovx induce la localización nuclear de las proteínas ciclinas D1 y D3 en los epitelios glandular y luminal respectivamente, indicando la existencia de una regulación diferencial de la proliferación en estos tipos celulares (Zhuang *et al.*, 2001). Sin embargo, hasta el momento se desconoce si la expresión de estas proteínas es tejido-específica en los epitelios uterinos de la rata durante el ciclo estral.

Vía de Señalización de Akt/PKB y su regulación por estrógenos

Las proteínas PI3K comprenden una extensa y compleja familia de cinasas implicadas en un amplio rango de vías de señalización asociadas con la proliferación celular, supervivencia, síntesis de proteínas, angiogénesis y crecimiento tumoral (Chen *et al.*, 2005; Duronio, 2008). De acuerdo a su estructura y a sus sustratos específicos, las proteínas PI3K se han clasificado en tres tipos denominadas I, II y III, y éstas a su vez, en múltiples subunidades e isoformas (Kandel y Hay, 1999; Chen *et al.*, 2005; Duronio, 2008; Franke, 2008). Las PI3K de tipo I han sido las más estudiadas ya que se han asociado con diversas funciones celulares incluyendo crecimiento, proliferación y supervivencia celular. Más aún, las alteraciones de los genes que codifican a estas cinasas, como su mutación y amplificación, se encuentran implicadas en diversos tipos de cáncer (Meng *et al.*, 2006; Zhao y Vogt, 2008). Las proteínas tipo I consisten de dos subfamilias: la clase IA y la clase IB. Las proteínas PI3K de clase IA son heterodímeros que consisten de una subunidad catalítica (p110) y una subunidad regulatoria (p85), las cuales son activadas por receptores que poseen actividad de tirosina cinasa (RTK de Receptor tirosine kinase) o receptores acoplados a proteínas tirosina cinasa tipo-Src. La clase IB esta compuesta de heterodímeros de una subunidad regulatoria (p101) y una subunidad catalítica (p110 γ) y son activadas por receptores acoplados a proteínas G (GPCR de G protein-coupled receptors) (Lopez-Illasaca *et al.*, 1999; Hawkins *et al.*, 2006; Franke, 2008).

Una vez que el ligando se une a los RTK provoca la activación de la PI3K lo cual induce la síntesis del segundo mensajero fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3 de phosphatidyinositol-3,4,5-triphosphate) a partir de fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP2 de phosphatidyinositol-4,5-biphosphate). PIP3 promueve el reclutamiento de la proteína cinasa B (PKB de Protein Kinase B) o bien conocida como Akt a la membrana celular para su subsecuente activación (Marte y Downward, 1997; Chen *et al.*, 2005) (Figura v). Akt, es una proteína cinasa de serina-treonina que funciona como un regulador crítico de diferentes procesos como son la supervivencia celular, la proliferación celular, la apoptosis, entre otros. En los mamíferos, se han identificado 3 proteínas Akt denominadas Akt 1 (ó PKB α), Akt 2 (ó PKB β) y Akt 3 (ó PKB γ), las cuales son productos de diferentes genes localizados en los cromosomas 14q32, 19q13 y 1q44, respectivamente (Song *et al.*, 2005). Estructuralmente, Akt posee en el extremo amino terminal un dominio homólogo a plecstrina (PH de Pleckstrin homology) que interacciona con lípidos de membrana como el PIP3 producto de la acción de la PI3K. En la región central, tiene un dominio catalítico de cinasa que contiene un residuo de treonina 308 (Thr³⁰⁸), cuya fosforilación es necesaria para la activación de Akt. En el extremo carboxilo terminal posee un dominio regulatorio que contiene un segundo sitio de fosforilación en serina 473 (Ser⁴⁷³) también necesario para la activación de esta cinasa (Nicholson y Anderson, 2002; Song *et al.* 2005; Shtilbans *et al.*, 2008). Se ha demostrado que la activación de Akt mediante la fosforilación en Thr³⁰⁸ y Ser⁴⁷³ ocurre a través de la activación de PI3K en respuesta a diversos factores de crecimiento y estímulos extracelulares como IGF-I, insulina, E₂, factor de necrosis tumoral, PDGF, prolactina, factor inhibitorio de leucemia (LIF de Leukaemia inhibitory factor), EGF, entre otros (Kandel y Hay, 1999; Toyofuku *et al.*, 2006; Shtilbans *et al.*, 2008).

Diversos estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado los efectos del E₂ sobre la expresión y actividad de Akt. En células endometriales se ha reportado que la administración de E₂ y tamoxifeno induce un incremento tanto en los niveles de expresión como en la localización nuclear de la forma fosforilada de la proteína Akt en Ser⁴⁷³ (p-Akt Ser⁴⁷³) 15 min después del tratamiento hormonal, regresando a niveles basales a los 90 min. La expresión de p-Akt Ser⁴⁷³ inducida por el E₂ es bloqueada por el tratamiento con wortmanina (inhibidor de PI3K), no así con ICI (Guzeloglu-Kayisli *et al.*, 2004), lo que sugiere que la activación de Akt es independiente del RE. Sin embargo, se ha reportado que el E₂ no induce la fosforilación de Akt en células endometriales de ratones Knock out para RE- α , sugiriendo que esta activación es dependiente del RE- α (Klotz *et al.*, 2002). Estudios *in vivo* han demostrado que en el útero de ratones ovx el tratamiento con E₂ induce un incremento en la expresión de p-Akt tanto en Ser⁴⁷³ como en Thr³⁰⁸ 2 h después del tratamiento hormonal, alcanzando su máxima expresión a las 8 h y regresando a niveles basales 16 h después de la administración de E₂. El pretratamiento con P₄ atenúa la acción del E₂ sobre la fosforilación de ambos residuos Ser⁴⁷³ y Thr³⁰⁸ de Akt (Chen *et al.*, 2005). En el útero de ratas ovx la fosforilación de Akt en Ser⁴⁷³ es constitutiva mientras que el tratamiento con E₂ induce la

fosforilación de Akt sólo en Thr³⁰⁸ 2 h después del tratamiento hormonal, alcanzando su máxima expresión 6 h después de la administración de E₂ (Lengyel *et al.*, 2004), lo que sugiere que en ratas ovx la activación de Akt vía fosforilación en Thr³⁰⁸ es dependiente de E₂. Durante el ciclo estral de la rata se han demostrado altos niveles de expresión de p-Akt durante el proestro, metaestro y diestro en las células de los epitelios luminal y glandular, mientras que durante el estro estos niveles de expresión disminuyen (Dery *et al.*, 2003).

En la vía de señalización de Akt, una de las proteínas blanco es la cinasa 3 de la sintetasa de glucógeno (Gsk3 de glycogen synthase kinase 3). Gsk3 es una cinasa de serina-treonina involucrada en diversos procesos celulares como apoptosis, regulación génica, ciclo celular, migración celular, entre otros (Grimes y Jope, 2001; Jope *et al.*, 2007). Se ha demostrado que la fosforilación de las dos isoformas de Gsk3 es una de las formas de regular su actividad enzimática. La fosforilación de los residuos de tirosina 279 (Tyr²⁷⁹) y tirosina 216 (Tyr²¹⁶) incrementan la actividad de Gsk3 α y Gsk3 β respectivamente, mientras que la fosforilación de los residuos de Ser²¹ y Ser⁹ las regula negativamente. Existen diversas cinasas como AKT, PKA (de protein kinase A) y PKC capaces de inducir la fosforilación de Gsk3 en los residuos de Ser (Jope *et al.*, 2007). Se ha demostrado que Gsk3 β promueve la proteólisis de la ciclina D1 a través de su fosforilación en la Thr²⁸⁶ lo cual promueve su exportación del núcleo al facilitar su asociación con una exportina nuclear (CRM1 de Chromosome Region Maintenance 1) (Diehl *et al.*, 1998; Gladden y Diehl, 2005; Alao, 2007). La actividad de esta cinasa (Gsk3 β) sobre la ciclina D1 es regulada de forma negativa a través de su fosforilación en Ser⁹ (Hughes *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 1994; Diehl *et al.*, 1998) (Figura v).

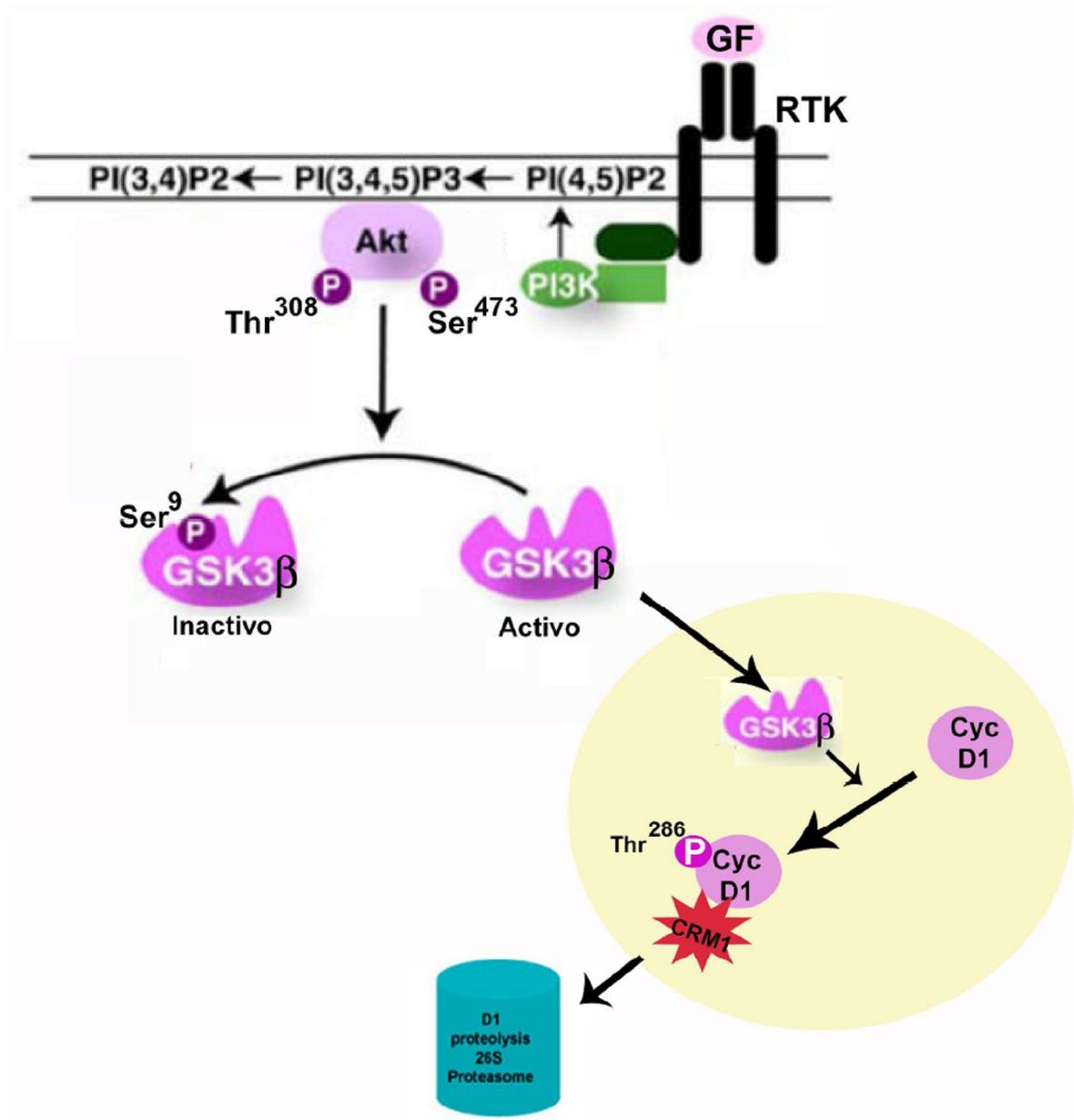


Figura v. Vía de señalización de PI3K/AKT/Gsk3β. La unión del factor de crecimiento a RTK induce la activación de PI3K, la cual cataliza la síntesis de PIP3 a partir de PIP2. PIP3 promueve el reclutamiento de AKT a la membrana celular para su subsecuente activación vía su fosforilación en los residuos Thr³⁰⁸ y Ser⁴⁷³. La forma activa de Gsk3β fosforila a la ciclina D1 en Thr²⁸⁶ facilitando su exportación nuclear por CRM1, ubiquitinización y degradación por el proteosoma 26S. Akt inhibe la actividad catalítica de Gsk3β a través de su fosforilación en Ser⁹ (Jope *et al.*, 2007 modificado).

Diversos estudios han demostrado el papel de las hormonas esteroides en la regulación de la actividad de Gsk3 β . En el útero de ratones ovx el tratamiento con E₂ induce un incremento en los niveles de expresión de la forma fosforilada de la proteína Gsk3 β -Ser⁹ 2 h después del tratamiento hormonal, alcanzando su máxima expresión a las 8 h y regresando a niveles basales 16 h después de la administración de E₂ (Chen *et al.*, 2005; Kazi *et al.*, 2009). Además de forma paralela a la inducción de la fosforilación inhibitoria de Gsk3 β -Ser⁹ por E₂, se reportó un incremento en la acumulación nuclear de ciclina D1 en las células epiteliales del útero. El pretratamiento con P₄ disminuye tanto los niveles de expresión de la forma fosforilada de Gsk3 β -Ser⁹ inducida por el E₂ como los niveles de expresión nuclear de la ciclina D1 en las células epiteliales uterinas. Tanto el tratamiento con E₂ como con P₄ no modifica los niveles de expresión de la forma fosforilada de Gsk3 β -Tyr²¹⁶ (Chen *et al.*, 2005). Estos datos sugieren que las hormonas sexuales esteroides regulan la actividad de Gsk3 β a través de su fosforilación en Ser⁹ lo cual juega un papel importante en la localización celular de la ciclina D1 y el progreso del ciclo celular en las células epiteliales uterinas.

Antiestrógenos

Los antiestrógenos pueden ser clasificados en tres grandes grupos de acuerdo a su estructura y actividad biológica: los antiestrógenos puros, como el ICI 182,780, (tipo I), son antiestrógenos esteroidales (Figura vi) que pertenecen a una nueva clase de terapia antihormonal denominada SERDs (de Selective Estrogen Receptor Down-regulators). Los SERDs actúan como potentes antagonistas induciendo una rápida degradación del RE y no presentan actividad agonista en los tejidos blanco de los estrógenos, por lo que difieren en su mecanismo de acción con los SERMs (de Selective Estrogen Receptor Modulators), representados por los análogos del raloxifeno (tipo II) y análogos del tamoxifeno o sus metabolitos (Tipo III), los cuales son compuestos no esteroidales (Figura vi) que pueden actuar como agonistas mimetizando el efecto biológico de los estrógenos, o como antagonistas inhibiendo la acción estrogénica dependiendo del tejido blanco donde actúen (Katzenellenbogen *et al.*, 1995; Macgregor y Jordan, 1998; Hall *et al.*, 2001).

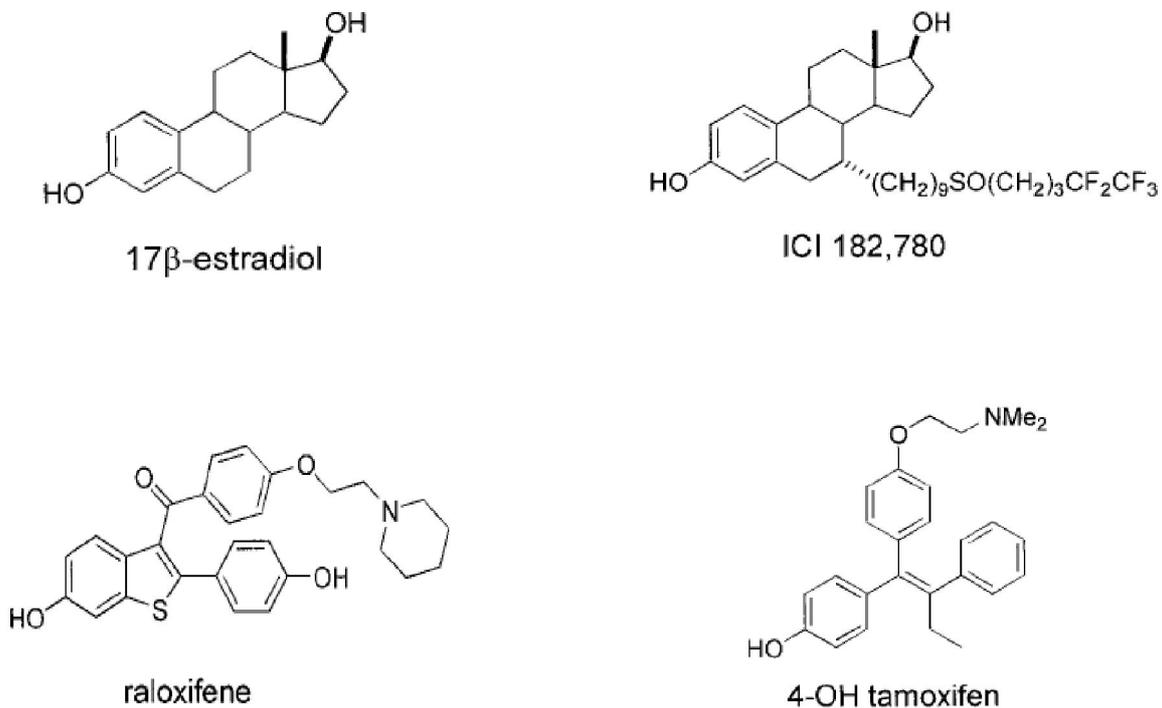


Figura vi. Estructura química del 17β-estradiol y de algunos antiestrógenos. Estructura química del ICI 182,780, antiestrógeno esterooidal; raloxifeno y tamoxifeno, antiestrógenos no esteroidales.

Mecanismo de acción del antiestrógeno ICI 182,780

Uno de los antagonistas estrogénicos más ampliamente utilizados es el ICI 182,780 (ICI, Fulvestrant o Faslodex), el cual es un análogo 7α- alquilsulfonil del E₂ (Figura vi). El mecanismo de acción del ICI es el de un antagonista puro para el RE-α y el RE-β en tejidos blanco de los estrógenos como es el útero (Wakeling *et al.*, 1991, 1995). ICI, al igual que el tamoxifeno, inhibe competitivamente la unión del E₂ con el RE, sin embargo, ICI posee mayor afinidad que el tamoxifeno por el RE. Comparando la afinidad de unión del E₂ por el RE (1.0), la afinidad de unión del ICI y tamoxifeno es 0.89 y 0.025 respectivamente (Wakeling y Bowler, 1987; Wakeling *et al.*, 1991).

El mecanismo de acción del ICI involucra su unión con el RE, una vez formado el complejo ICI-RE se induce un cambio conformacional en el dominio de unión de ligando del RE, específicamente en la posición de la hélice 12, lo cual previene la dimerización del receptor, el traslado del receptor del citoplasma al núcleo y su unión al ADN (Fawell *et al.*, 1990; Dauvois *et al.*, 1993; Long y Nephew, 2006). Si algún complejo ICI-RE entra al núcleo es transcripcionalmente inactivo porque las dos funciones de

activación del RE (AF-1 y AF-2) se encuentran bloqueadas, además de que este complejo es inestable resultando en una acelerada degradación de la proteína del RE (Nicholson *et al.*, 1995b). Esta regulación negativa de la proteína del RE ocurre sin una disminución del ARNm. Por lo tanto el ICI se une, bloquea y acelera la degradación de la proteína del RE, permitiendo una completa inhibición de la vía de señalización del E₂ a través del RE- α y RE- β (Figura vii) (Osborne *et al.*, 1995; Wakeling *et al.*, 1995, 2000; Wardley, 2002; Osborne *et al.*, 2004).

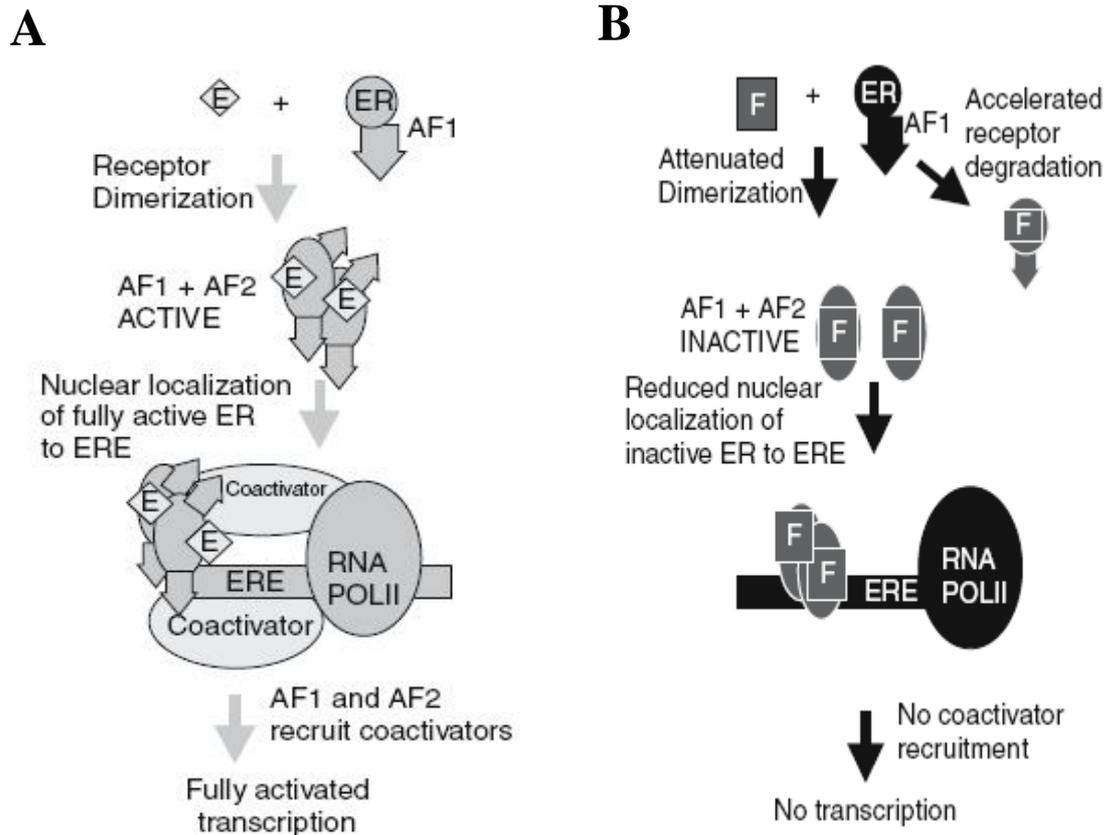


Figura vii. Mecanismo de acción del 17β-estradiol y fulvestrant (ICI). A) El E se une al ER, el complejo E-ER dimeriza e interactúa con los ERE en el ADN. La activación de la transcripción inducida por E involucra la interacción de las dos funciones de activación (AF1 y AF2) del ER con coactivadores transcripcionales lo que estimula la actividad de la RNA Pol II. B) El F se une al ER, induce la degradación del ER, reduce la dimerización, localización nuclear, e interacción del complejo F-ER con los ERE. Las dos funciones de activación (AF1 y AF2) del ER están inactivas, bloqueando el proceso de transcripción. E, estradiol; F, fulvestrant (ICI); ERE, elementos de respuesta a estrógenos; ER, receptor a estrógenos (Dowsett *et al.*, 2005, modificado).

Diversos estudios *in vitro* e *in vivo* han descrito los efectos antagonistas del tratamiento con ICI sobre la proliferación celular y la expresión de proteínas reguladas por el E₂. En cultivos de células MCF-7, T47D y ZR75-1 se ha demostrado que el tratamiento con ICI disminuye la expresión de la proteína del RE- α y del RP inducida por el E₂ (Nicholson *et al.*, 1995a; Watts *et al.*, 1995; McClelland *et al.*, 1996; Wijayaratne *et al.*, 1999), disminuye los niveles de expresión total y de la forma fosforilada de la proteína de EGFR (Hutcheson *et al.*, 2003), disminuye los niveles de expresión tanto del ARNm como de la proteína de ciclina D1 (Watts *et al.*, 1995; Wilken *et al.*, 1996; Doisneau-Sixou *et al.*, 2003; Tan *et al.*, 2009), induce un arresto en la fase G1 del ciclo celular, disminuye la proporción de células en la fase S del ciclo celular e induce un incremento en la expresión de la proteína Rb hipofosforilada (Watts *et al.*, 1995). Los niveles del ARNm y de la proteína de ciclina D3, ciclina E, Cdk2 y Cdk4 inducidos por el tratamiento con E₂ en células T47D y MCF-7 no son afectados por el tratamiento con antiestrógenos (Musgrove *et al.*, 1993; Watts *et al.*, 1995; Wilken *et al.*, 1996). En ratones ovx, el cotratamiento con ICI + E₂ bloquea la proliferación de los epitelios uterinos inducida por el E₂ (Zhu y Pollard, 2007), disminuye el 90 % del peso del útero y vagina inducidos por el E₂, benzoato de E₂ y estrona (Wakeling y Bowler, 1992; Martel *et al.*, 1998a). En el útero de ratas postnatales, el tratamiento con ICI (0.1-100 μ g/rata) disminuye el peso del útero y la inmunotinción del RE en los epitelios luminal y glandular, así como en el estroma, comparado tanto en animales sin tratamiento como en animales tratados con tamoxifeno (agonista estrogénico en útero) (Branham *et al.*, 1996). En el útero de ratas inmaduras ovx, el tratamiento con ICI (3 mg/kg) bloquea el incremento en los niveles del ARNm de c-fos, del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF de Vascular endothelial growth factor) y del factor de crecimiento parecido a insulina (IGF-I de Insulin-like growth factor-1) inducidos por el E₂ (40 μ g/kg) y tamoxifeno (1 mg/kg) (Huynt y Pollak, 1993; Hyder *et al.*, 1997). Se ha reportado que el ICI es 3 veces más afín al RE que su antecesor ICI 164,384 mostrando una afinidad de unión por el RE uterino de 0.89 y 0.19 respectivamente comparado con el E₂ (Martel *et al.*, 1998b). El pretratamiento con ICI (500 μ g/rata) reduce la unión del [³H]E₂ al RE en útero, glándula pituitaria y tejido adiposo (Wade *et al.*, 1993), disminuye el peso uterino (Wade *et al.*, 1993; Sahlin y Eriksson, 1996; Dipippo y Powers, 1997; Clark *et al.*, 2003) y la expresión de la proteína del RP (Clark *et al.*, 2003) inducido tanto por el benzoato de E₂ como por el E₂. La expresión tanto del ARNm como de la proteína del RE incrementa 24 h después del tratamiento con 2.5 μ g de E₂/rata en el útero de ratas adultas ovx, el incremento en la expresión de esta proteína, no así la del ARNm, es bloqueada por el cotratamiento con 100 ó 1000 μ g de ICI + 2.5 μ g E₂/rata (Sahlin y Eriksson, 1996). En mujeres postmenopáusicas con carcinoma mamario el tratamiento con ICI (6 mg ó 18 mg) induce una disminución en los niveles de expresión del RE y Ki-67 (De Friend *et al.*, 1994).

A pesar de que existe un gran número de estudios que demuestran que el ICI ejerce una acción antagonista sobre la proliferación celular endometrial y la expresión de proteínas reguladas por E₂, diversos autores reportan algunos efectos estrogénicos del ICI en modelos tanto *in vitro* como *in vivo*. En

células MCF-7, el tratamiento con ICI induce 5% de los genes regulados a la alta por E₂ (Frasor *et al.*, 2004), en células endometriales humanas el tratamiento con ICI no induce efectos antiproliferativos (Wu y Guo, 2006), en neuronas del cerebro de ratas neonatas induce un incremento significativo en la fosforilación de ERK 1/2 (Wong *et al.*, 2003), en ovejas incrementa el peso del útero y los niveles del ARNm de la GAPDH en el estroma y el epitelio glandular uterino (Robertson *et al.*, 2001), durante el ciclo estral de ovejas intactas induce la secreción de oxitocina y prostaglandina F₂α (al-Matubsi *et al.*, 1998), en el hígado de besugos incrementa el efecto del E₂ sobre los niveles de calcio plasmático y regula a la alta la expresión del RE-α (Pinto *et al.*, 2006). Lo anterior demuestra que el ICI tiene efectos agonistas y antagonistas sobre diversas respuestas estrogénicas en diferentes tejidos y modelos experimentales. Además se ha observado que en los tejidos del tracto reproductivo la expresión de diversos genes es diferente en animales ovx comparado con animales intactos bajo condiciones fisiológicas como es el ciclo estral (Molnar y Murphy, 1994; Nandha *et al.*, 1999; Cameron *et al.*, 2002), por lo que la dinámica celular del útero durante el ciclo estral no puede ser mimetizada mediante el uso de modelos farmacológicos como ratas ovx tratadas con hormonas sexuales esteroides exógenas.

Planteamiento del Problema

Se ha propuesto que los estrógenos inducen la replicación del ADN y la proliferación celular en el útero de animales ovx mediante la inducción de proto-oncogenes y proteínas que participan en la transición de la fase G1 a S del ciclo celular. En este modelo se ha demostrado que el tratamiento con E₂ induce la localización nuclear de las proteínas ciclinas D1 y D3 en los epitelios glandular y luminal respectivamente, sugiriendo la existencia de una regulación diferencial de la proliferación en estos tipos celulares. Sin embargo, no se ha estudiado bajo condiciones fisiológicas si existe una expresión diferencial de las ciclinas D1 y D3 en los epitelios uterinos y si ésta se correlaciona con el patrón de proliferación celular uterina durante la transición estro-metaestro del ciclo estral de la rata. En diversos modelos experimentales se ha demostrado que el ICI presenta actividad agonista y antagonista sobre la proliferación celular y la expresión de proteínas reguladas por el E₂. En el útero de ratas ovx, se ha demostrado que el ICI se comporta como un antagonista estrogénico puro. Sin embargo, se desconoce si bajo condiciones fisiológicas el ICI presenta actividad antiestrogénica en el útero de la rata durante el ciclo estral y de ser así, la manera que afecta la regulación de la proliferación celular de los epitelios uterinos y la expresión de proteínas reguladas por el E₂.

Hipótesis de Trabajo

En el modelo farmacológico de inducción de la proliferación celular con E_2 en el útero de ratas ovx, se sabe que las ciclinas tipo D y las cinasas 4 y 6 dependientes de ciclinas son importantes para el inicio y progresión del ciclo celular, y su expresión depende de la acción del E_2 vía su $RE\alpha$. Por lo tanto, se espera que en el modelo fisiológico, el patrón de expresión de estas proteínas esté regulada por los cambios hormonales que se presentan durante el ciclo estral y que la administración de ICI, antagonista del RE, inhiba la proliferación del epitelio uterino y la expresión de proteínas reguladas por el E_2 .

Objetivos

Objetivo General

Estudiar los mecanismos moleculares que regulan la proliferación de los epitelios uterinos durante la transición estro–metaestro bajo condiciones fisiológicas, tales como el ciclo estral de la rata.

Objetivos Particulares

- Analizar el patrón de proliferación celular de los epitelios luminal y glandular del útero de la rata durante la transición estro-metaestro del ciclo estral.
- Analizar el patrón de expresión de las proteínas RE- α , c-Fos, Ciclina D1, Ciclina D3, Cdk4 y Cdk6 en los epitelios luminal y glandular del útero de la rata durante la transición estro-metaestro del ciclo estral.
- Analizar los niveles séricos de E₂ y P₄ durante la transición estro-metaestro del ciclo estral de la rata.
- Analizar el efecto de ICI, antagonista del RE- α , sobre la proliferación celular, peso húmedo del útero, expresión de las proteínas del RE- α y del RP, en el útero de ratas ovx tratadas con E₂.
- Analizar el efecto de ICI sobre la proliferación celular, peso húmedo del útero, expresión de las proteínas RE- α , RP, Ciclina D1, Akt y Gsk3- β en el útero de ratas intactas durante el ciclo estral.
- Analizar los niveles séricos de E₂ y P₄ en animales intactos tratados con ICI.

Materiales y Métodos

Animales

Se usaron ratas hembras adultas de la cepa Wistar (*Rattus Norvegicus*) de 200-250 g y ratones hembras adultas de la cepa CD-1 de 25-35 g (Harlan, México). Todos los animales fueron mantenidos en un ciclo luz:oscuridad (12 h: 12 h), con agua y comida *ad libitum*.

Los comités institucionales de cuidado y uso de animales de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, aprobaron los protocolos experimentales. Los animales fueron manipulados de acuerdo con la guía de cuidado y uso de animales de laboratorio de los Institutos Nacionales de Salud y la guía oficial mexicana de la secretaría de agricultura (SAGARPA NOM-062-Z00-1999) publicada en 2001. Se tomaron las medidas necesarias para minimizar el número de animales usados y su sufrimiento.

Tratamientos

Dos modelos experimentales fueron utilizados: ratas hembras intactas con ciclos estrales regulares y ratas y ratones hembras ovx.

Animales intactos: Se utilizaron ratas hembras adultas que presentaron por lo menos 3 ciclos estrales regulares de 4 días de duración, cada cual fue determinado por medio del análisis microscópico de frotis vaginales diarios. Dos horas antes de sacrificar a los animales por decapitación se les administró por vía intraperitoneal (i.p) 50 mg/kg de peso corporal de BrdU en PBS. Inmediatamente después de sacrificar a los animales se obtuvo el útero, se pesó y se procesó para determinación de proliferación celular, inmunohistoquímica y western blot. La sangre se recolectó para cuantificación de E₂ y P₄ en suero. Tres grupos experimentales fueron utilizados:

Grupo 1: Grupos de 5 ratas hembras intactas se sacrificaron a diferentes tiempos durante la transición estro-metaestro: 13:00, 17:00 y 21:00 h del estro y 00:00, 03:00, 06:00, 09:00 y 13:00 h del metaestro.

Grupo 2: Grupos de 4 ratas hembras intactas fueron inyectadas por vía subcutánea (s.c) con 500 µg/rata de ICI ó propilenglicol (vehículo) a las 08:00 h del proestro. Las ratas se sacrificaron a las 13:00 h del metaestro.

Grupo 3: Grupos de 4 ratas hembras intactas fueron inyectadas por vía s.c con 500 µg/rata de ICI ó propilenglicol (vehículo) a las 00:00 h del estro. Las ratas se sacrificaron a las 13:00 h del metaestro.

Animales ovariectomizados: Ratas y ratones hembras adultas de 10 a 12 semanas de edad fueron ovariectomizadas vía incisión lateral abdominal bajo anestesia con Ketamina (Inoketam, virbac). Dos horas antes de sacrificar a los animales se les administró por vía i.p 50 mg/kg de peso corporal de BrdU en PBS. Inmediatamente después de sacrificar a los animales por decapitación se obtuvo el útero, se pesó y se procesó para determinación de proliferación celular, inmunohistoquímica y western blot. La sangre se recolectó para cuantificación de E₂ y P₄ en suero. Dos grupos experimentales fueron utilizados:

Grupo 1: Dos semanas después de ovariectomizar a ratones hembras adultas se les administró por vía s.c 100 ng de E₂/ratón por dos días. Seis días después se les administró:

a) vía s.c propilenglicol (V); b) vía s.c 50 ng de E₂/ratón (E₂); c) vía s.c 1 mg/100 g de ICI, 2 h después vía s.c 50 ng de E₂/ratón (E₂ + ICI); d) vía s.c 1 mg/100 g de ICI (ICI). Los animales se sacrificaron 15 h después de los tratamientos hormonales.

Grupo 2: Dos semanas después de ovariectomizar a ratas hembras adultas se les administró por vía s.c 10 µg de E₂/rata por dos días. Seis días después se les administró:

a) vía s.c propilenglicol (V); b) vía s.c 5µg de E₂/rata (E₂); c) vía s.c 500µg de ICI/rata, 2 h después vía s.c 5µg de E₂/rata (E₂ + ICI); d) vía s.c 500µg de ICI/rata (ICI). Los animales se sacrificaron 15 h después de los tratamientos hormonales.

La dosis de ICI usada en este estudio fue seleccionada en base a previos estudios en animales ovx tratados con E₂ en donde los efectos del E₂ fueron bloqueados por la administración de ICI en un rango 100-1000 µg/rata (Wakeling y Bowler, 1992; Wade *et al.*, 1993; Sahlin y Eriksson, 1996; Dipippo y Powers, 1997; Clark *et al.*, 2003; Stygar *et al.*, 2003; Zhu y Pollard, 2007)

Procesamiento del Tejido

Para determinación de proliferación celular e inmunohistoquímica: Los úteros fueron fijados en paraformaldehído al 4% en PBS durante 2 h a 4° C, posteriormente fueron deshidratados, impregnados e incluidos en parafina. Se hicieron cortes de 4-5 µm de grosor y se colocaron en laminillas tratadas con poli-L-lisina (Sigma).

Para western blot: Los úteros se colocaron en solución amortiguadora de lisis con inhibidores de proteasas (DTT 1 mM, Tris-HCl 10 mM, glicerol 30%, EDTA 1 mM, Tritón X-100 1%, leupeptina 5 µg/mL, aprotinina 5 µg/mL, pepstatina 2 µg/mL, PMSF 1 mM, ortovanadato de sodio 1 mM, azida de

sodio 15 mM, disuelto en PBS) aproximadamente 1 mL de solución por cada 100 mg de tejido y se homogeneizaron usando un politrón (Brinkmann, Westbury, New York). Se transfirieron las muestras homogeneizadas a tubos eppendorf de 1.5 mL. Los tubos se mantuvieron en hielo por 30 minutos y se centrifugaron a 12,000 rpm por 30 min a 4° C, el sobrenadante fue recolectado y almacenado a -20° C. La concentración de proteína total fue determinada por el método de Bradford (Laboratorio Bio-Rad, Hercules, CA) (Bradford, 1976).

Determinación de proliferación celular

Los cortes histológicos que previamente se habían colocado en laminillas tratadas con poli-L-lisina (Sigma) se desparafinaron y se rehidrataron. Se llevó a cabo la recuperación del antígeno hirviendo los cortes en citrato de sodio 10 mM pH=6 (2 veces por 10 min), se dejó enfriar el citrato de sodio a temperatura ambiente (TA). Después de lavar los cortes con PBS se permeabilizaron con tritón X-100 al 0.5% por 10 min. Se bloqueó con albúmina 5% 30 min y posteriormente se incubó con el anticuerpo primario monoclonal anti-BrdU en una dilución 1:10 en buffer de incubación (66 mM Tris, 0.66 mM MgCl₂, 1 mM 2-mercaptoetanol) por 1 h a 37° C. Los cortes se lavaron en PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario anti-mouse-IgG-fluoresceinado 1:10 en PBS durante 2 h a TA. Después de lavar los tejidos con PBS fueron montados con medio de montaje para fluorescencia (DAKO Corporation, Carpinteria, CA). Las células marcadas se observaron en un microscopio de fluorescencia Eclipse E600 (Nikon Co, LTD, Tokio, Japón). Se midió la cantidad de núcleos BrdU positivos en los epitelios luminal y glandular y se expresó como el porcentaje del número total de células epiteliales. Se analizaron cinco cortes por animal. N=5 animales por tiempo estudiado ó tratamiento realizado.

Inmunohistoquímica

Los cortes histológicos que previamente se habían colocado en laminillas pretratadas con poli-L-lisina se desparafinaron y se rehidrataron. Se llevó a cabo la recuperación del antígeno hirviendo los cortes en citrato de sodio 10 mM pH=6 (2 veces por 10 min). Se bloqueó la peroxidasa endógena con H₂O₂ al 3% en PBS durante 30 min. Se permeabilizó con tritón X-100 al 0.5% y se bloqueó con albúmina 5%-H₂O₂ 1% durante 30 min. Posteriormente se incubó toda la noche con los diferentes anticuerpos primarios en las siguientes diluciones: RE- α 1:100; c-Fos 1:200; ciclina D1 1:100; ciclina D3 1:100; Cdk4 1:100; Cdk6 1:100; p-Gsk3- β Ser⁹ 1:100 (sc-542, sc-52, sc-717, sc-182, sc-260, sc-7181, sc-11757-R, respectivamente, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA) en cámara húmeda a 4° C. Para el control negativo, se omitió el anticuerpo primario. Después de lavar con PBS, se incubó con el anticuerpo secundario biotinilado goat anti-rabbit IgG (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA) por 2 h a una dilución 1:100 y después con el complejo avidina-biotina (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa

Cruz, CA) por 1 h a TA. El revelado se realizó con diaminobencidina (DAB) y se contratiñó con hematoxilina. Las células marcadas se observaron en un microscopio de Luz (Nikon, Modelo E600). Se analizaron 5 cortes por animal. N= 5 animales por tiempo estudiado ó 4 por tratamiento realizado. El score de tinción nuclear fue el siguiente: - no hay núcleos inmunopositivos; + número bajo de núcleos inmunopositivos; ++ número moderado de núcleos inmunopositivos; +++ número grande de núcleos inmuopositivos. El score histológico fue realizado por tres observadores independientes.

Western blot

Se utilizaron 30 µg de proteína total de útero a los cuales se les adicionó solución amortiguadora de carga (Tris 0.5 M pH 6.8, glicerol 10%, SDS 2%, β-mercapto etanol 5%) en una proporción 1:1 en volumen. Los extractos proteicos se calentaron a 94° C por 5 min y se separaron mediante electroforesis SDS-PAGE al 10% a 95 volts durante 2 h. Las proteínas fueron transferidas a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF, Millipore Co, Billerica, Massachusetts) a 20 volts durante 1 h a TA. Posteriormente las membranas fueron bloqueadas por 2 h a TA con una solución de leche descremada en polvo al 10 % en TBS-Tween (TBS + Tween 20 al 0.1%). Las membranas fueron incubadas durante 2 h a TA con los siguientes anticuerpos RE-α, 1:2000; RP, 1:1000; cyclin D1, 1:1000; Akt, 1:2000; p-Akt Ser⁴⁷³, 1:1000; Gsk3-β, 1:2000; p-Gsk3-β Ser⁹, 1:1000; α-tubulina, 1:5000 (sc-542, sc-1492, sc-717,sc-8312, sc-7985-R, sc-9166, sc-11757-R, sc-5286, respectivamente, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA) en TBS-Tween 20. Las membranas fueron lavadas con TBS-Tween 20, 3 veces por 10 min. Posteriormente las membranas fueron incubadas con anticuerpo secundario anti-conejo y anti-ratón (IgG-HRP, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA) en una dilución 1:20,000 por 1 h a TA. Las membranas fueron reveladas por quimioluminiscencia (Amersham Biosciences, Fairfield CT). El análisis densitométrico de las proteínas de interés y de α-tubulina se llevó a cabo mediante la digitalización de las placas radiográficas usando el aparato Scan Primax Colorado 600p (Primax, Utrecht, The Netherlands) y la imagen se analizó con el programa KODAK 1D 3.6. Los resultados se expresan como el contenido de la proteína de interés con respecto a la expresión del control de carga α-tubulina.

Radioinmunoensayo

La cuantificación de los niveles séricos de E₂ y P₄ en los animales de estudio se realizó con el Kit Coat-A-Count (Diagnostics Products Corporation, Los Angeles CA, USA). La sensibilidad de este método para la detección de E₂ fue de 5.4 pg/mL y de 8.3 ng/mL para la P₄. Los coeficientes de variación intra e inter ensayo fueron de 5.3% y 8 % para E₂ respectivamente y 6.5% y 10% para P₄ respectivamente.

Análisis estadístico

Los datos de incorporación de BrdU, western blot y radioinmunoanálisis fueron analizados usando la prueba de Análisis de Varianza de una sola vía (ANOVA) seguida por una prueba de Tukey. El programa Prism 2.01 (Graph Pad, San Diego, CA) fue usado para calcular los valores de probabilidad.

Resultados

Patrón de proliferación celular de los epitelios uterinos de la rata durante la transición estro-metaestro

Para determinar el patrón de proliferación de las células epiteliales uterinas durante la transición estro-metaestro se evaluó la incorporación de BrdU, como índice de síntesis de ADN, en las células de los epitelios luminal y glandular del útero de la rata.

Durante la transición estro-metaestro se observó que el epitelio glandular fue el primer tipo de epitelio en presentar núcleos BrdU positivos, los cuales fueron detectados desde las 21:00 h del estro (Figs. 1 y 2). Un incremento significativo en el número de núcleos marcados se observó a las 00:00 h del metaestro ($30.9 \pm 4.9\%$), presentando su máxima actividad proliferativa a las 03:00 h del metaestro ($56.9 \pm 8.3\%$), y manteniendo estos niveles de proliferación hasta las 13:00 h del metaestro (Figs. 1 y 2).

En cambio, en el epitelio luminal la proliferación celular inicia a las 03:00 h del metaestro presentando un porcentaje de núcleos BrdU positivos del $10.1 \pm 1.7\%$, estos niveles incrementan en las siguientes horas, presentando un valor máximo ($38.7 \pm 5.5\%$) a las 13:00 h del metaestro (Figs. 1 y 2). De forma interesante, en el epitelio luminal se observó que las células que proliferan forman “islas de proliferación” conformadas de grupos de células BrdU positivas rodeadas por áreas donde no hay proliferación, como se muestra en las Figs. 1E y F.

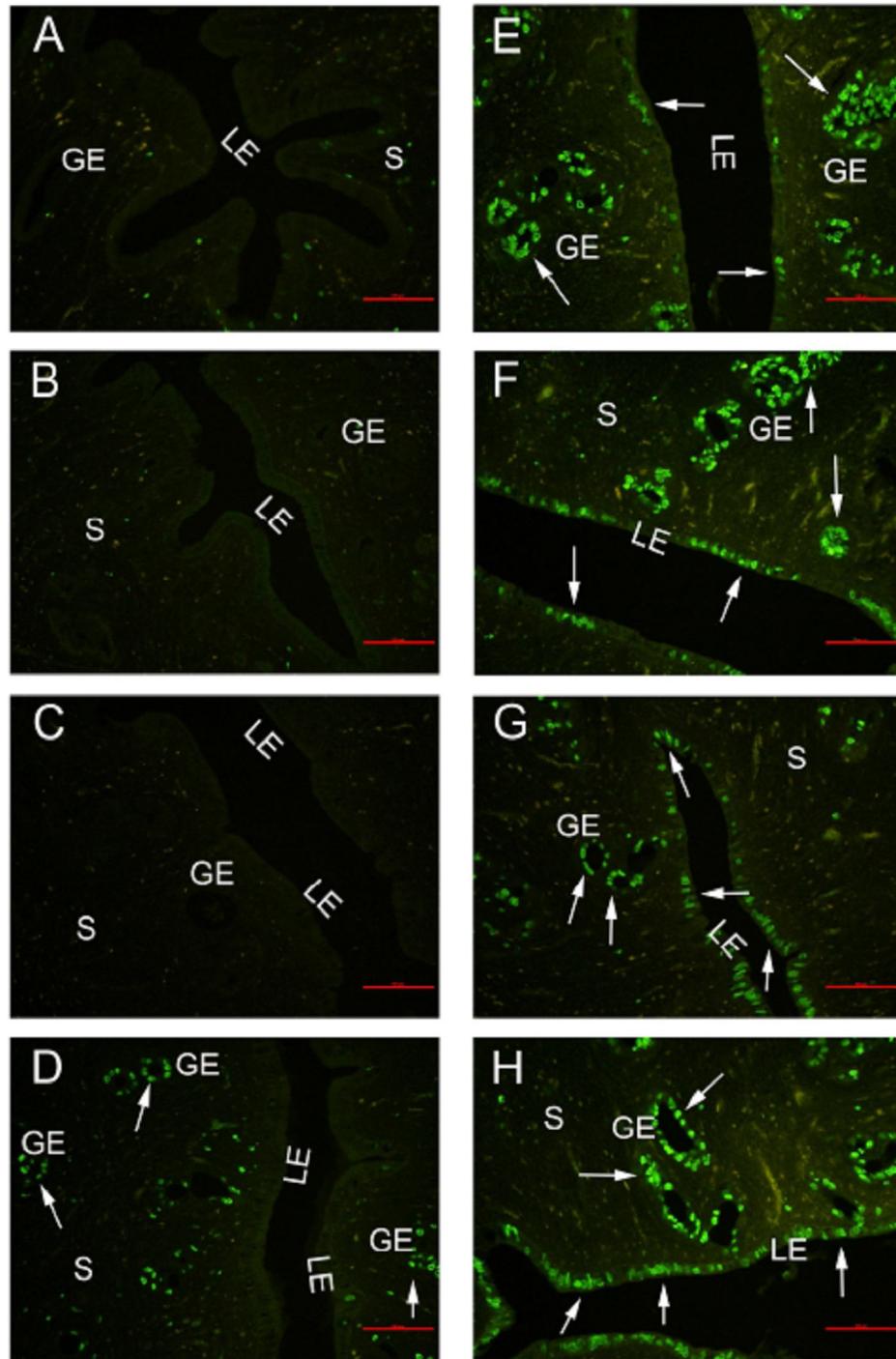


Figura 1. El epitelio glandular uterino de la rata prolifera antes que el epitelio luminal durante el ciclo estral. Incorporación de BrdU en los epitelios uterinos de la rata en los diferentes tiempos de estudio durante la transición estro-metaestro del ciclo estral. (A) E 13:00 h, (B) E 17:00 h, (C) E 21:00 h, (D) M 00:00 h, (E) M 03:00 h, (F) M 06:00 h, (G) M 09:00 h, (H) M 13:00 h. Las flechas indican núcleos positivos para la incorporación de BrdU. E, estro; M, metaestro; LE, epitelio luminal; GE, epitelio glandular; S, estroma. Barra= 100µm.

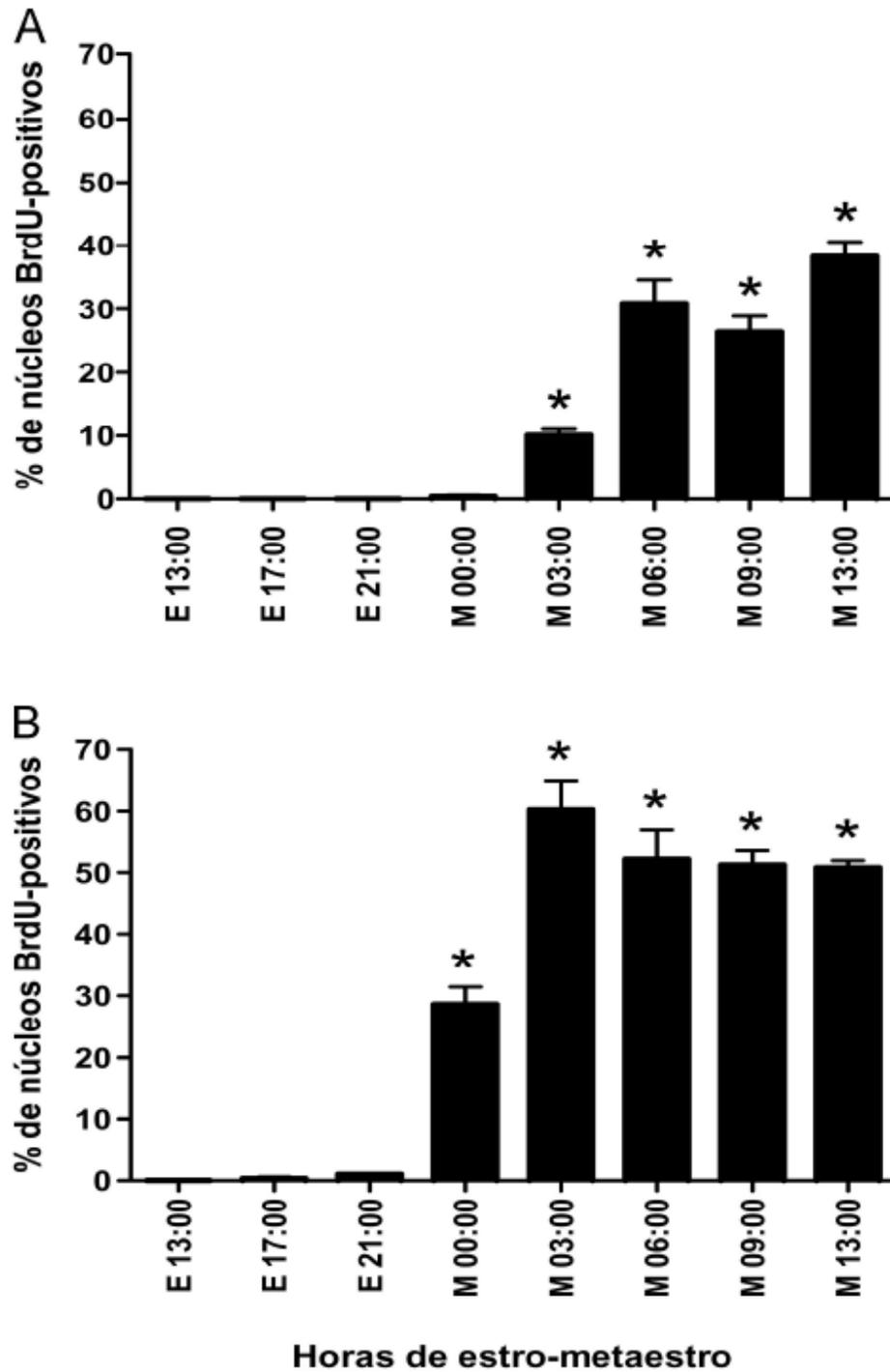


Figura 2. Cuantificación de la incorporación de BrdU en los epitelios uterinos durante la transición estró-metaestro. Se cuantificaron los núcleos inmunofluorescentes en el (A) epitelio luminal y en el (B) epitelio glandular del útero de 5 animales por cada tiempo estudiado. E, estró; M, metaestro. Los resultados se expresan como la media \pm ESM. En (A) $*p < 0.05$ comparado con E 13:00, 17:00, 21:00 h y M 00:00. En (B) $*p < 0.05$ comparado con E 13:00, 17:00 y 21:00 h.

Expresión de la proteína del RE- α en los epitelios uterinos de la rata durante la transición estro-metaestro

La expresión de la proteína del RE- α en el útero de animales intactos durante la transición estro-metaestro fue detectada por medio de inmunohistoquímica. La inmunoreactividad para el RE- α fue detectada en núcleo y en citoplasma de ambos epitelios uterinos (Fig. 3). El número más bajo de núcleos positivos para el RE- α fue detectado a las 13:00 h del estro (Fig. 3 y Tabla 1). Un incremento significativo de núcleos positivos para el RE- α se observó en el epitelio luminal a las 21:00 h del estro (Fig. 3C). El número de núcleos positivos aumento hasta las 09:00 h del metaestro (Fig. 3G) y estos niveles se mantuvieron hasta las 13:00 h del metaestro (Fig. 3I y Tabla 1). En el epitelio glandular se observó una intensa inmunotinción nuclear durante todo el curso temporal de estudio (Figs. 3B, D, F, H, J y Tabla 2).

Expresión de la proteína c-Fos en los epitelios uterinos de la rata durante la transición estro-metaestro

Para determinar si hay una correlación positiva entre la iniciación de la proliferación de las células del endometrio y la expresión de c-Fos en el útero de animales intactos, se detectó mediante inmunohistoquímica la expresión de la proteína de c-Fos durante la transición estro-metaestro del ciclo estral de la rata. La menor cantidad de núcleos inmunopositivos para c-Fos en el epitelio luminal fue detectada a las 13:00 y 17:00 h del estro (Fig. 4A, Tabla 1). Un incremento notorio en la inmunotinción nuclear de c-Fos fue observado desde las 21:00 h del estro hasta las 13:00 h del metaestro (Figs. 4C, E, G e I). En el epitelio glandular una intensa inmunotinción nuclear fue observada durante todo el curso temporal (Figs. 4B, D, F, H, J y Tabla 2).

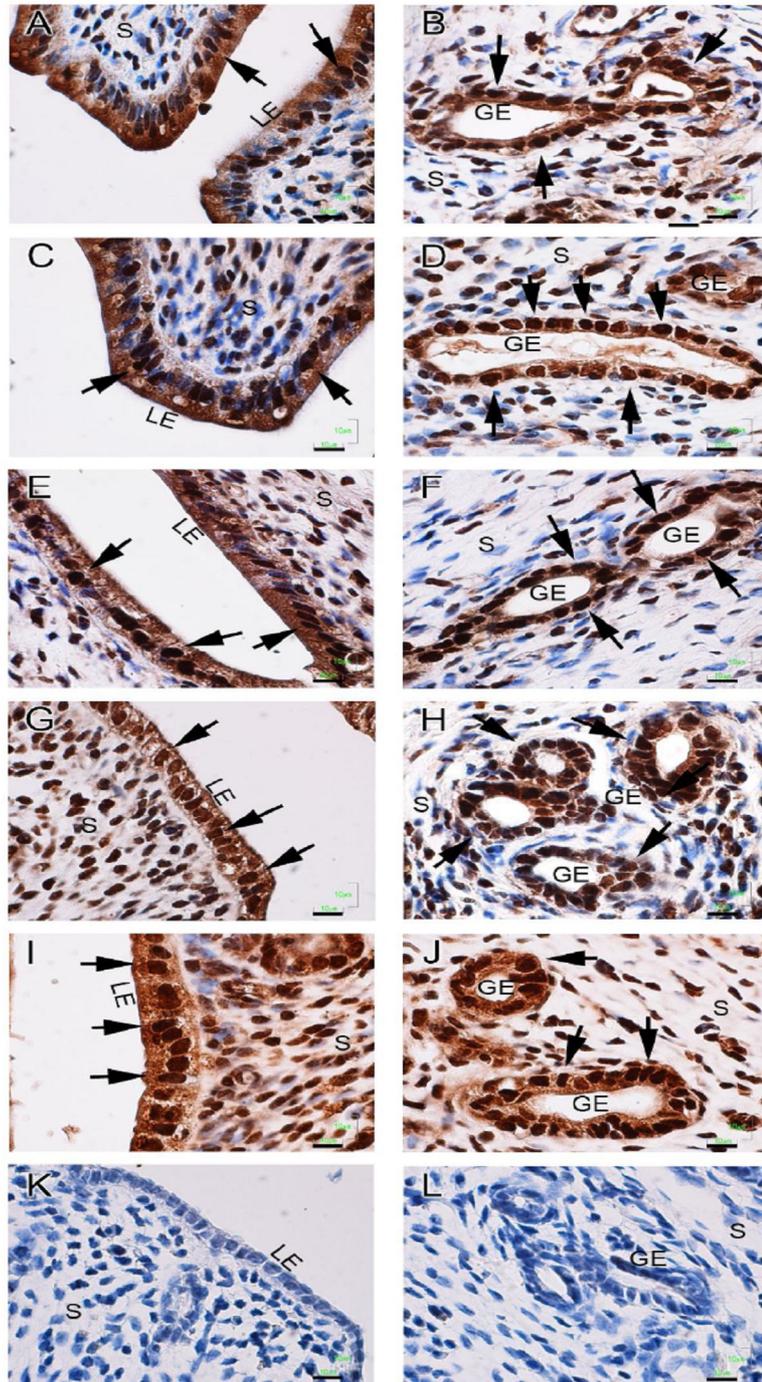


Figura 3. La localización nuclear del RE- α precede a la proliferación celular de los epitelios uterinos de la rata durante la transición estro-metaestro. Localización de la proteína del RE- α por inmunohistoquímica en: (A y B) E 13:00 h; (C y D) E 21:00 h; (E y F) M 03:00 h; (G y H) M 09:00 h; (I e J) M 13:00 h; (K y L) Control negativo. Las flechas indican núcleos marcados. LE, epitelio luminal; GE, epitelio glandular; S, estroma; E, estro; M, metaestro. Barra= 10 μ m

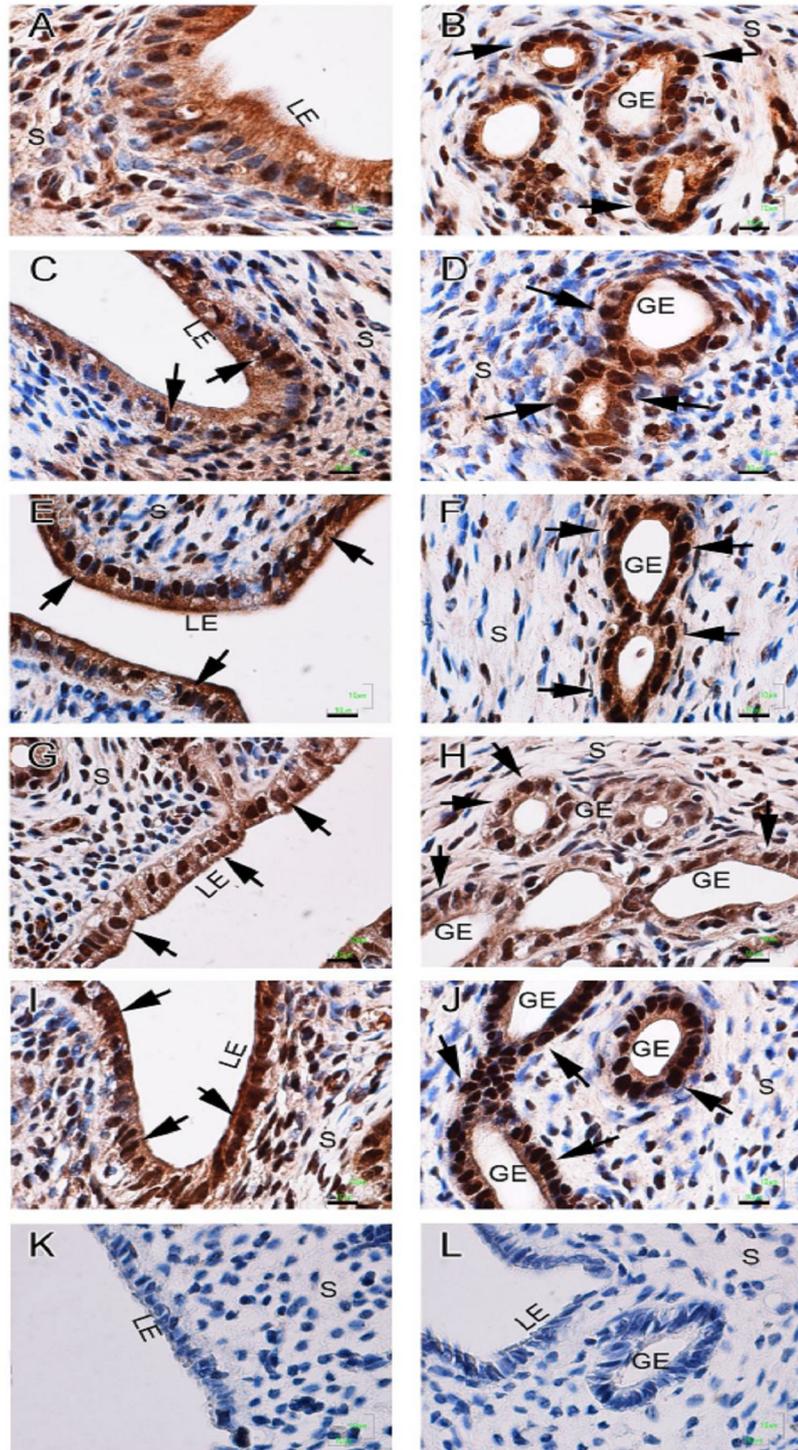


Figura 4. Localización celular de la proteína de c-Fos en los epitelios uterinos de la rata durante la transición estro-metaestro. (A y B) E 13:00 h; (C y D) E 21:00 h; (E y F) M 03:00 h; (G y H) M 09:00 h; (I e J) M 13:00 h; (K y L) Control negativo. Las flechas indican núcleos marcados. LE, epitelio luminal; GE, epitelio glandular; S, estroma; E, estro; M, metaestro. Barra= 10 μ m

Curso temporal de expresión de ciclinas D1 y D3 durante la proliferación de las células epiteliales uterinas

Para determinar si existe un patrón de expresión diferencial en cuanto a los tipos celulares uterinos entre las ciclinas D1 y D3, se detectó la localización celular de ambas ciclinas mediante inmunohistoquímica durante la transición estro-metaestro del ciclo estral de la rata. La expresión de las proteínas ciclinas D1 y D3 se detectó en ambos epitelios uterinos (luminal y glandular), y presentan una localización tanto nuclear como citoplasmática (Figs. 5 y 6).

En el epitelio luminal, la ciclina D1 se localiza predominantemente en el citoplasma durante las 13:00 y 17:00 h del estro, mientras que la ciclina D3 fue la primera en ser detectada en el núcleo celular a las 17:00 h del estro. En este estudio temporal se observó un incremento en la inmunotinción nuclear de las proteínas ciclinas D1 y D3 desde las 13:00 hasta las 21:00 h del estro, el cual precede a la incorporación de BrdU. A las 21:00 h del estro se detectó el mayor número de núcleos inmunopositivos para ciclinas D1 y D3 (Figs. 5C y 6C, Tabla 1). Una reducción en la localización nuclear de ambas ciclinas fue detectada en el epitelio luminal desde las 00:00 hasta las 13:00 h del metaestro (Figs. 5 y 6, Tabla 1). Sin embargo, la localización nuclear de la ciclina D3 disminuye más rápidamente que la de la ciclina D1. A las 13:00 h del metaestro se detectó una intensa tinción citoplasmática de ambas ciclinas, sin presentar localización nuclear de la ciclina D1, mientras que algunos núcleos presentaron tinción para la ciclina D3 (Figs. 5I y 6I).

En el epitelio glandular, la ciclina D1 se detectó en el núcleo a las 13:00 h del estro (Fig. 5B, Tabla 2), presentando una máxima tinción nuclear a las 21:00 h del estro (Fig. 5D), posteriormente los niveles decrecen lentamente durante las siguientes horas de estudio (Figs. 5F y H), presentando predominantemente una localización citoplasmática a las 13:00 h del metaestro (Fig. 5J). En cambio, la ciclina D3 se detectó predominantemente en el citoplasma a las 13:00 h del estro (Fig. 6B), ésta se relocaliza en el núcleo a las 17:00 h del estro (Tabla 2) y regresa al citoplasma desde las 06:00 hasta las 09:00 h del metaestro (Fig. 6H). Finalmente a las 13:00 h del metaestro algunos núcleos de las células del epitelio glandular presentan inmunotinción para la ciclina D3 (Fig. 3J, Tabla 2). El periodo de localización nuclear y el sitio de inducción inicial de ambas ciclinas (D1 y D3) en las células de los epitelios luminal y glandular se representan en la Fig. 9.

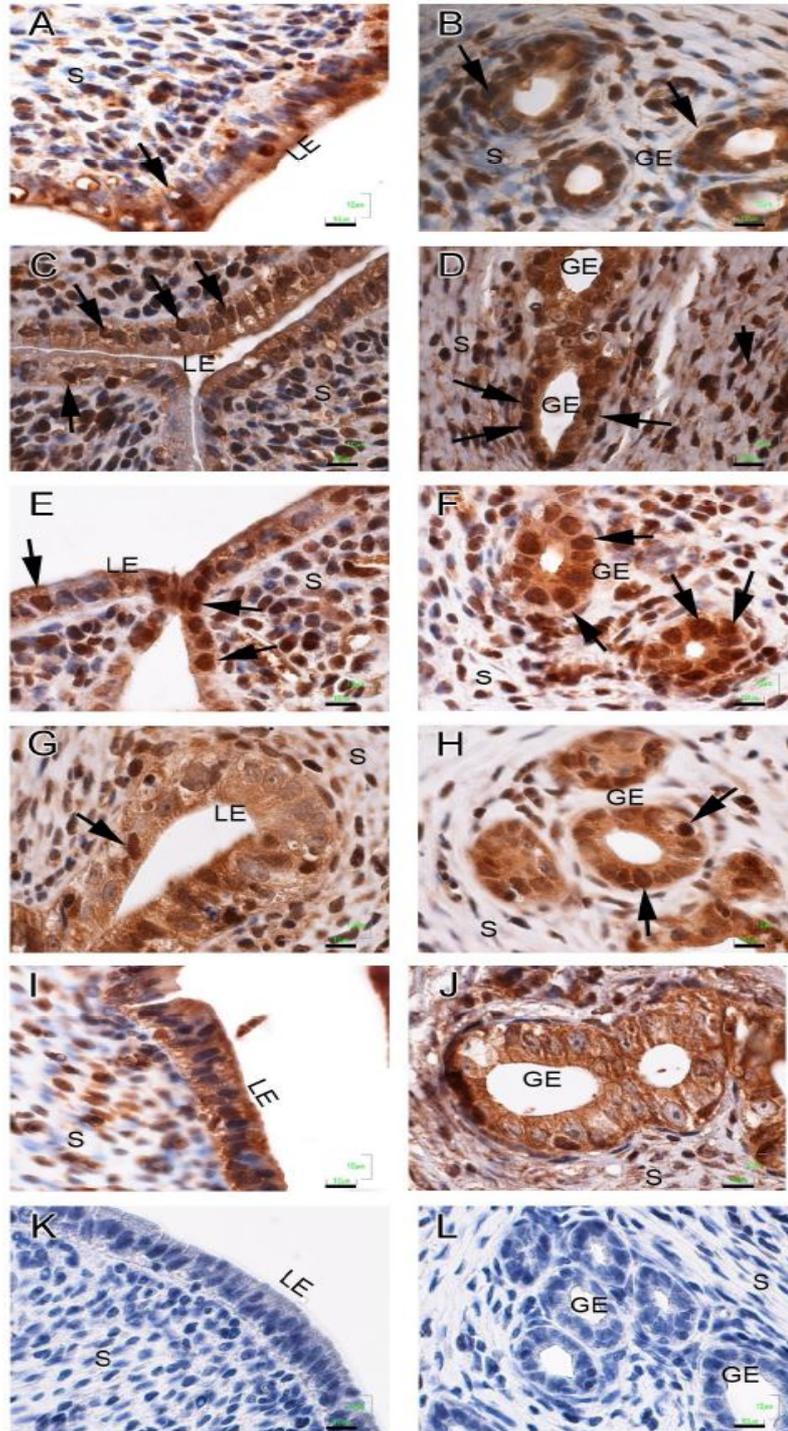


Figura 5. Cambios en la localización de ciclina D1 del citoplasma al núcleo de las células epiteliales del útero de la rata durante la transición estro-metaestro. Localización inmunohistoquímica de la proteína ciclina D1 en: (A y B) E 13:00 h; (C y D) E 21:00 h; (E y F) M 03:00 h; (G y H) M 09:00 h; (I e J) M 13:00 h; (K y L) Control negativo. Las flechas indican núcleos marcados. LE, epitelio luminal; GE, epitelio glandular; S, estroma; E, estro; M, metaestro. Barra= 10µm

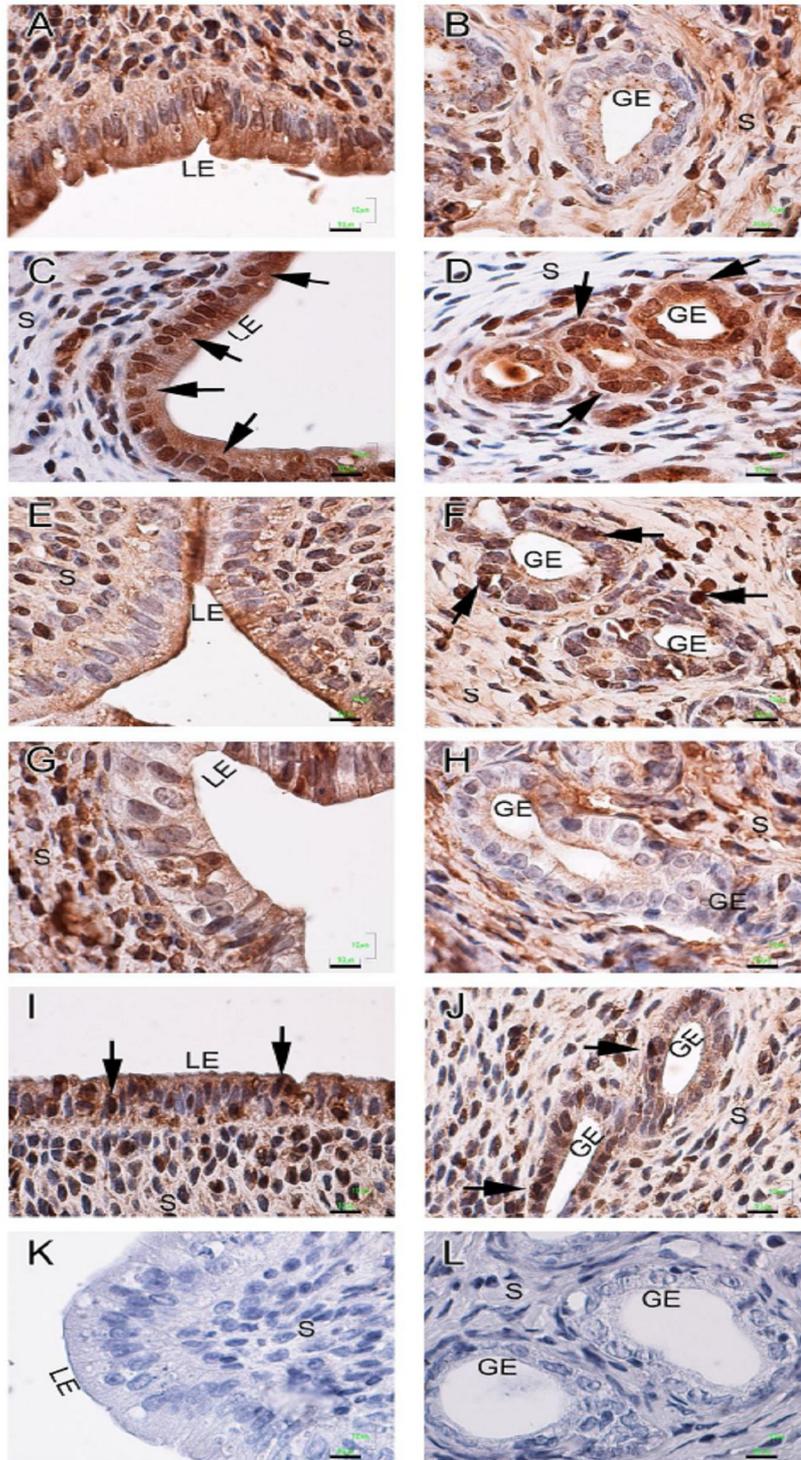


Figura 6. Ciclina D3 presenta una breve expresión nuclear en los epitelios uterinos de la rata durante la transición estro-metaestro. Localización inmunohistoquímica de la proteína ciclina D3 en: (A y B) E 13:00 h; (C y D) E 21:00 h; (E y F) M 03:00 h; (G y H) M 09:00 h; (I e J) M 13:00 h; (K y L) Control negativo. Las flechas indican núcleos marcados. LE, epitelio luminal; GE, epitelio glandular; S, estroma; E, estro; M, metaestro. Barra= 10µm

Cdk4 y Cdk6 presentan una constante localización nuclear en los epitelios uterinos a lo largo de la transición estro-metaestro

Las subunidades catalíticas de las ciclinas tipo D son las Cdk4 y 6. Se estudió la expresión de estas proteínas durante la transición estro-metaestro del ciclo estral de la rata. La inmunotinción de Cdk4 se detectó en núcleo y en citoplasma de ambos epitelios (luminal y glandular), manteniéndose casi constante durante todo el periodo de estudio (Fig. 7, Tabla 1 y 2). En contraste en el epitelio luminal, el número de núcleos positivos para Cdk6 presenta un ligero descenso desde las 13:00 h del estro hasta las 00:00 h del metaestro. En las siguientes horas (de 03:00 a 13:00 h del metaestro), el número de núcleos inmunopositivos incrementa a niveles similares a los observados a las 13:00 h del estro (Fig. 8).

Concentración sérica de E_2 y P_4 durante el ciclo estral de la rata

Los niveles de E_2 y P_4 fueron determinados en todos los animales de estudio. De forma interesante, los niveles más bajos de E_2 se encontraron durante la transición estro-metaestro comparado contra el proestro y diestro. En cambio los niveles más altos de P_4 se detectaron a las 13:00 h del metaestro (Tabla 3).

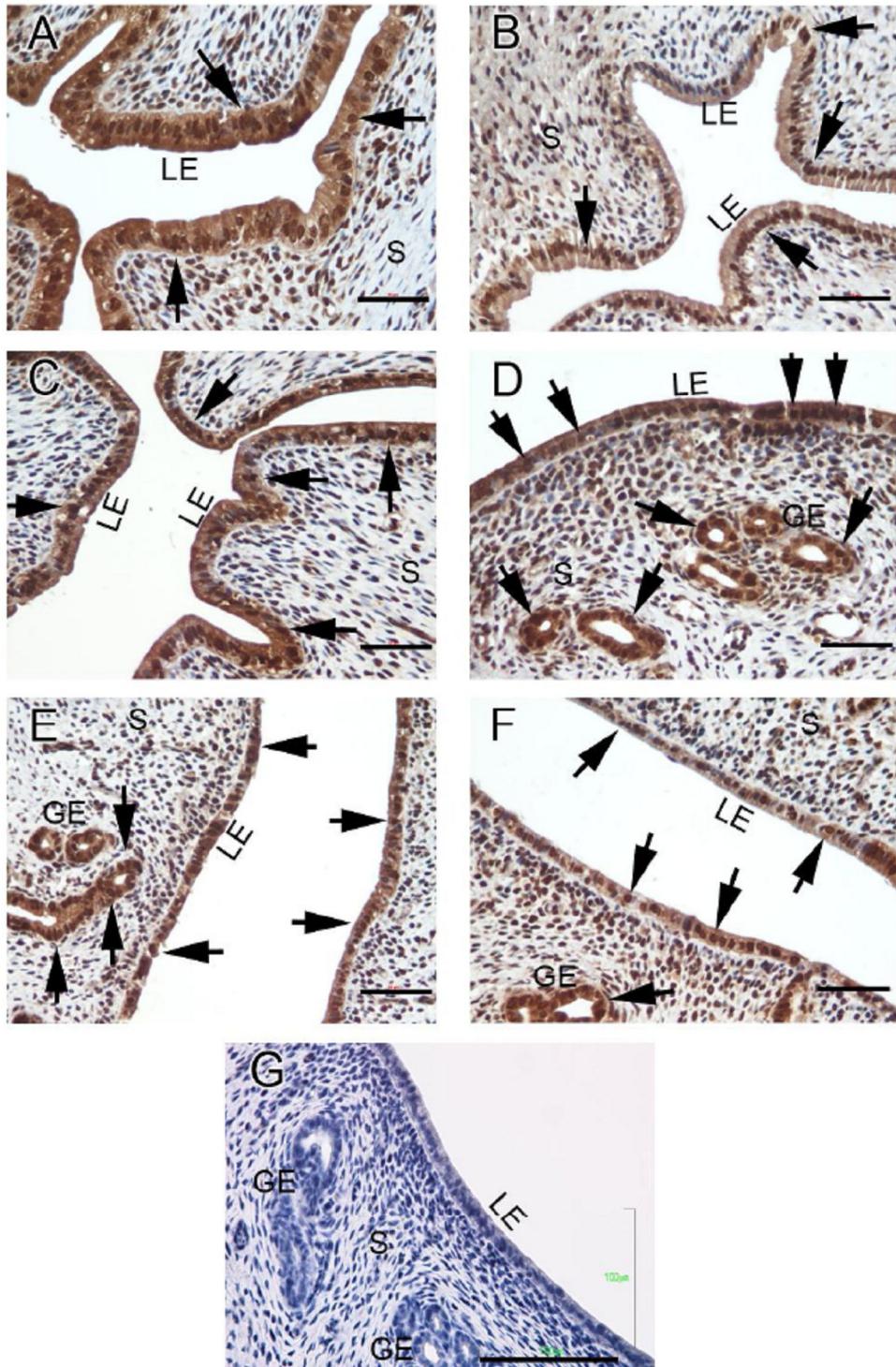


Figura 7. Localización nuclear permanente de Cdk4 en los epitelios uterinos de la ratona durante la transición estró-metáestro. Localización inmunohistoquímica de la proteína Cdk4 en: (A) E 13:00 h; (B) E 21:00 h; (C) M 00:00 h; (D) M 03:00 h; (E) M 09:00 h; (F) M 13:00 h; (G) Control negativo. Las flechas indican núcleos marcados. LE, epitelio luminal; GE, epitelio glandular; S, estroma; E, estró; M, metáestro. (A –F). Barra= 50 μm. (G) Barra= 100 μm.

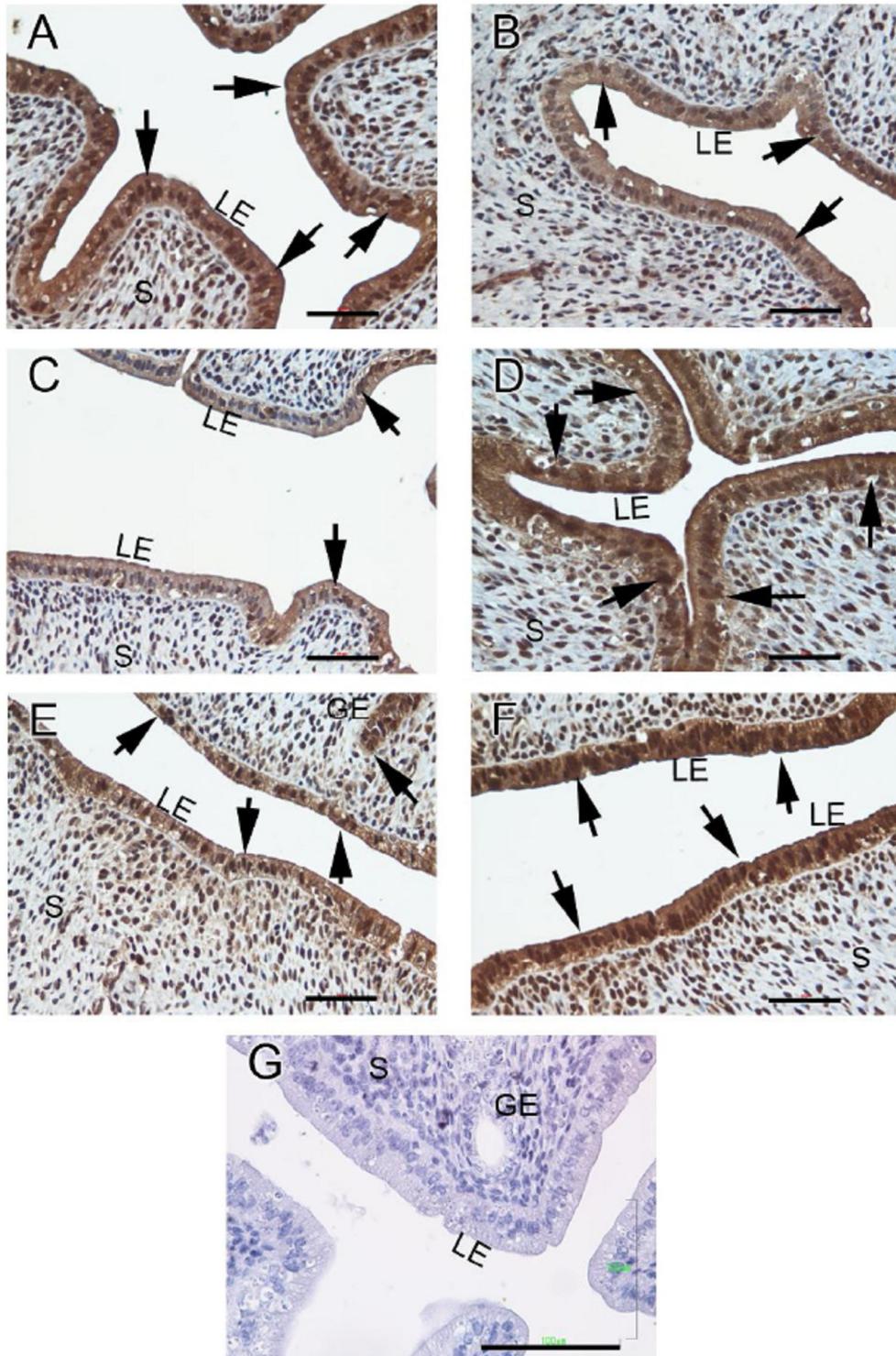


Figura 8. Localización inmunohistoquímica de la proteína Cdk6 en los epitelios uterinos de la rata durante la transición estro-metaestro. (A) E 13:00 h; (B) E 21:00 h; (C) M 00:00 h; (D) M 03:00 h; (E) M 09:00 h; (F) M 13:00 h; (G) Control negativo. Las flechas indican núcleos marcados. LE, epitelio luminal; GE, epitelio glandular; S, estroma; E, estro; M, metaestro. (A -F) Barra= 50 μ m. (G) Barra= 100 μ m.

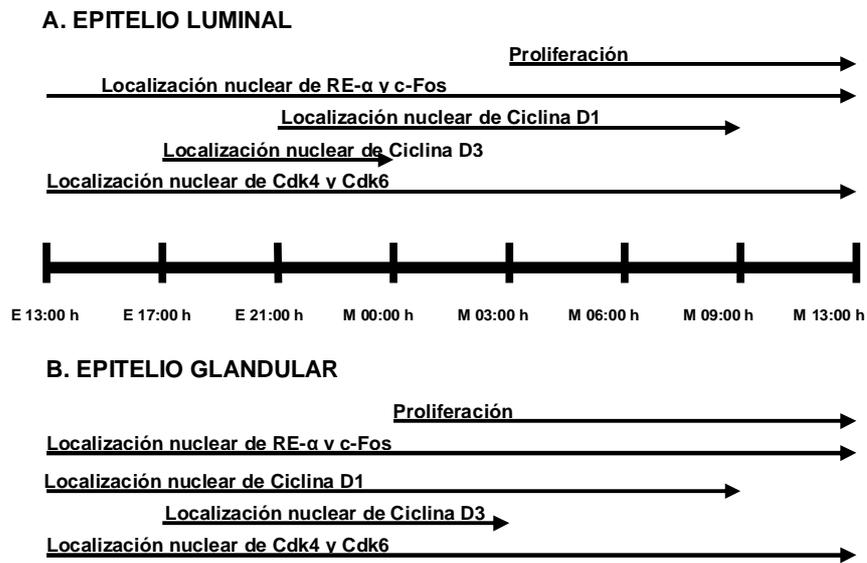


Figura 9. Representación esquemática de la secuencia de eventos que están involucrados en la inducción de la proliferación celular de los epitelios uterinos. (A) Epitelio Luminal. (B) Epitelio Glandular. Las flechas representan el curso temporal durante el cual las proteínas estudiadas y la incorporación de BrdU son detectadas en el núcleo de las células de los epitelios uterinos.

Tabla 1

Inmunotinción nuclear de las proteínas estudiadas en el epitelio luminal uterino durante la transición estro-metaestro

| | E 13:00 | E 17:00 | E 21:00 | M 00:00 | M 03:00 | M 06:00 | M 09:00 | M 13:00 |
|-------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| BrdU | - | - | - | - | + | ++ | +++ | +++ |
| ER α | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | +++ | +++ | +++ |
| Fos | + | ++ | ++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| cyc D1 | - | - | +++ | +++ | ++ | ++ | + | - |
| cyc D3 | - | + | +++ | ++ | - | - | - | + |
| cdk4 | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| cdk6 | +++ | ++ | ++ | ++ | ++ | +++ | +++ | +++ |

-, núcleos inmunopositivos no detectados; +, número bajo de núcleos inmunopositivos; ++, número moderado de núcleos inmunopositivos; +++, número alto de núcleos inmunopositivos. BrdU: incorporación de 5-bromo-2'-desoxi-uridina; cyc D1, ciclina D1; cyc D3, ciclina D3.

Tabla 2

Inmunotinción nuclear de las proteínas estudiadas en el epitelio glandular uterino durante la transición estro-metaestro

| | E 13:00 | E 17:00 | E 21:00 | M 00:00 | M 03:00 | M 06:00 | M 09:00 | M 13:00 |
|-------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| BrdU | - | - | - | ++ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| ER α | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| Fos | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| cyc D1 | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | + | + | - |
| cyc D3 | - | + | +++ | ++ | + | - | - | + |
| cdk4 | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| cdk6 | +++ | +++ | ++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ |

-, núcleos inmunopositivos no detectados; +, número bajo de núcleos inmunopositivos; ++, número moderado de núcleos inmunopositivos; +++, número alto de núcleos inmunopositivos. BrdU: incorporación de 5-bromo-2'-desoxi-uridina; cyc D1, ciclina D1; cyc D3, ciclina D3.

Tabla 3

Variaciones de los niveles de E₂ y P₄ en suero durante el ciclo estral de la rata

| Día del ciclo | E ₂ pg/mL (pmol/L) | P ₄ ng/mL (nmol/L) |
|-----------------|--|--|
| Proestro 13:00 | 65.3 \pm 7.89** (239.72 \pm 28.96) | 16.9 \pm 4.11 (53.74 \pm 13.07) |
| Estro 13:00 | 16.6 \pm 2.17 (60.94 \pm 7.97) | 10.3 \pm 3.69 (32.75 \pm 11.73) |
| Estro 17:00 | 18.7 \pm 5.21 (68.65 \pm 19.13) | 23.7 \pm 6.19 (75.37 \pm 19.68) |
| Estro 21:00 | 14.3 \pm 3.73 (52.49 \pm 13.69) | 18.3 \pm 5.02 (58.19 \pm 15.96) |
| Metaestro 00:00 | 18.3 \pm 4.27 (67.18 \pm 15.68) | 19.0 \pm 8.49 (60.42 \pm 27.00) |
| Metaestro 03:00 | 25.5 \pm 2.07 (93.61 \pm 7.60) | 29.9 \pm 7.89** (95.08 \pm 25.09) |
| Metaestro 06:00 | 15.7 \pm 4.68 (57.63 \pm 17.18) | 22.9 \pm 7.12 (72.82 \pm 22.64) |
| Metaestro 09:00 | 28.5 \pm 4.68 (104.62 \pm 17.18) | 29.5 \pm 6.07* (93.81 \pm 19.30) |
| Metaestro 13:00 | 24.5 \pm 2.60 (89.94 \pm 9.54) | 33.8 \pm 6.54** (107.48 \pm 20.80) |
| Diestro 13:00 | 33.0 \pm 5.11* (121.14 \pm 18.76) | 8.4 \pm 0.69 (26.71 \pm 2.19) |

Los niveles hormonales fueron determinados por RIA. Los resultados son expresados como la media \pm ESM de 5 animales por cada tiempo estudiado del ciclo estral. En E₂ **p < 0.001 comparado con todos los tiempos estudiados; *p < 0.05 comparado con E 13:00, E 17:00, E 21:00, M 00:00 y M 06:00 h. En P₄ **p < 0.01 comparado con P 13:00, E 13:00, E 21:00, D 13:00; *p < 0.05 comparado con P 13:00, E 13:00 y D 13:00 h.

ICI 182,780 bloquea la incorporación del BrdU en los epitelios uterinos de ratones y ratas ovx pero no en ratas intactas durante el ciclo estral

Uno de los principales efectos de la actividad estrogénica es la inducción de la síntesis de ADN en los epitelios uterinos después de la administración de la hormona. En este estudio se evaluó el efecto del ICI sobre la incorporación de BrdU en las células epiteliales uterinas de ratones y ratas ovxs tratadas con E₂. Los resultados nos indican un bajo porcentaje de núcleos BrdU positivos tanto en el epitelio luminal como en el glandular de ratones ($3.67 \pm 0.6\%$ y $5.93 \pm 0.9\%$) y ratas ($1.99 \pm 0.5\%$ y $2.21 \pm 0.9\%$) ovxs tratadas con vehículo (Figs. 10 y 11). Como se esperaba, el tratamiento con E₂ induce un incremento significativo en el porcentaje de núcleos BrdU positivos en los epitelios luminal y glandular de ratones ($89.89 \pm 2.8\%$ y $66.44 \pm 6.1\%$) y ratas ($20.96 \pm 0.7\%$ y $32.18 \pm 3.5\%$) ovxs. El incremento en la síntesis de ADN inducida por el E₂ fue bloqueado por el pretratamiento con ICI tanto en el epitelio luminal como en el glandular de ratones ($7.67 \pm 0.5\%$ y $17.4 \pm 2.8\%$) y ratas ($2.04 \pm 0.6\%$ y $5.74 \pm 1.5\%$) ovxs, mientras que los animales que recibieron solo ICI presentan niveles similares de síntesis de ADN al de los animales tratados con vehículo (Figs. 10 y 11).

El mecanismo molecular por el cual el E₂ induce la proliferación celular uterina ha sido ampliamente estudiado en animales ovx. Sin embargo, pocos estudios han sido realizados bajo condiciones fisiológicas como es el ciclo estral. Nuestros resultados muestran que durante el ciclo estral, los niveles de E₂ en circulación periférica alcanzan un máximo valor durante la mañana del proestro (Tabla 3) y las células epiteliales uterinas comienzan a proliferar aproximadamente 40 h después (00:00 a 03:00 h del metaestro) (Figs. 1 y 2), presentando el pico máximo de proliferación a las 13:00 h del mismo día (Fig. 2). Para evaluar si este proceso depende de la vía de señalización del RE- α , se administró ICI antes de que los niveles de E₂ en circulación periférica alcancen su máximo valor (08:00 h del proestro) o 24 h antes de que inicie la proliferación celular uterina (00:00 h del estro). De forma interesante, se observó que la administración de ICI en la mañana del proestro (08:00 h) induce una disminución significativa (de $48.31 \pm 4.9\%$ a $32.38 \pm 2.9\%$) en el porcentaje de células BrdU positivas del epitelio luminal, mientras que fue completamente ineficaz para inhibir la proliferación celular del epitelio glandular ($59.27 \pm 3.73\%$) comparado con el vehículo ($54.15 \pm 3.48\%$) (Fig. 12A, 12B y 12E). Por otro lado, cuando el antagonista del RE- α (ICI) se administró a las 00:00 h del estro, 24 h antes de que inicie la proliferación celular, la proliferación celular del epitelio luminal ($44.63 \pm 2.9\%$) y del epitelio glandular ($51.36 \pm 1.42\%$) no se afectó en comparación con los animales tratados con vehículo ($43.91 \pm 1.72\%$ y $56.10 \pm 3.18\%$, respectivamente) (Fig. 12C, 12D y 12F). Estos resultados difieren de lo observado en animales ovx tratados con E₂, en los cuales el ICI inhibe significativamente la proliferación celular de ambos epitelios uterinos (Figs. 10 y 11).

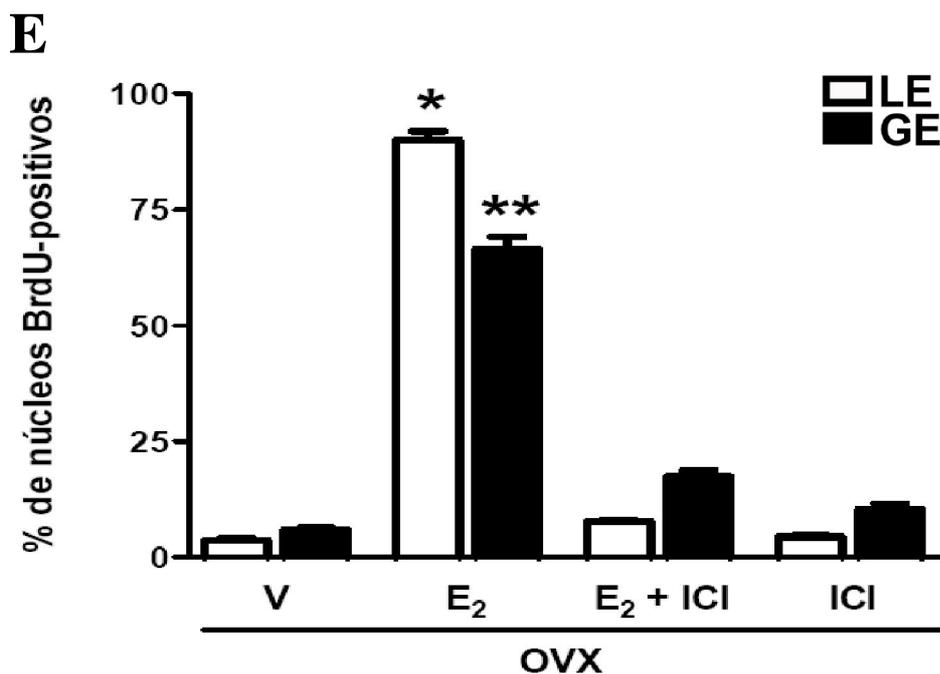
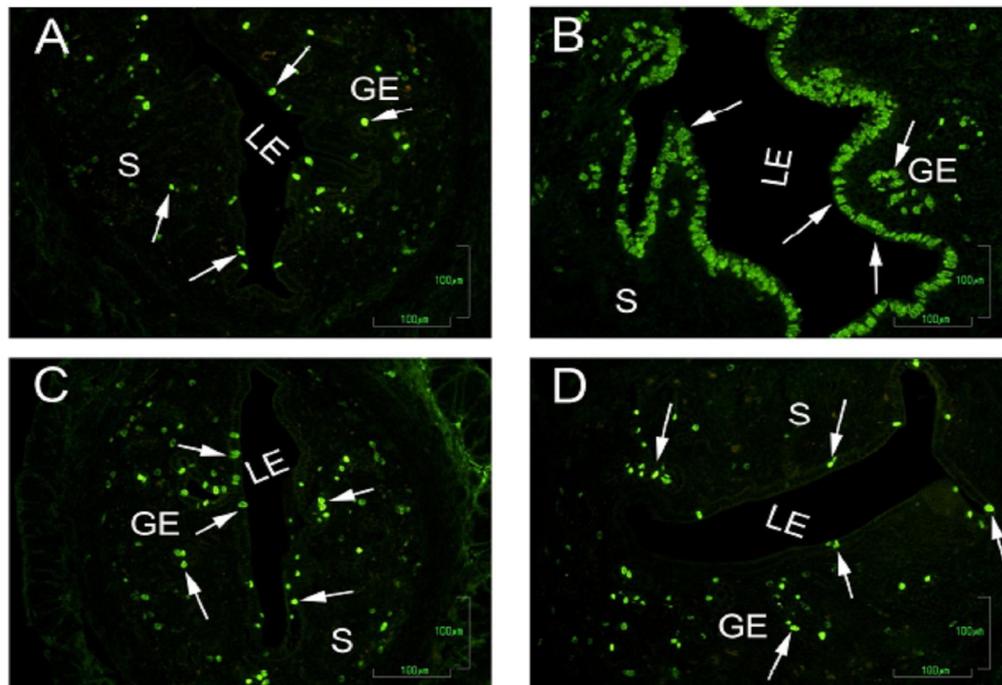


Figura 10. ICI 182,780 bloquea la proliferación de los epitelios uterinos inducida por E₂ en ratones ovx. La proliferación de los epitelios uterinos fue medida mediante la incorporación de BrdU en el tejido uterino después de la administración de (A) vehículo, (B) E₂ (C) E₂ + ICI 182,780 y (D) ICI 182,780. Las flechas indican núcleos positivos para la incorporación de BrdU. E, Cuantificación de la incorporación de BrdU en los epitelios uterinos después de los tratamientos mostrados en el eje de las X. Barras blancas, LE; Barras negras, GE. Los resultados se expresan como la media \pm ESM de 4 animales estudiados por tratamiento. En E * p <0.001 comparado con los otros tratamientos estudiados en LE, ** p <0.001 comparado con los otros tratamientos estudiados en GE. LE, epitelio luminal; GE, epitelio glandular; S, estroma; V, vehículo; E₂, estradiol. Barra= 100 μ m.

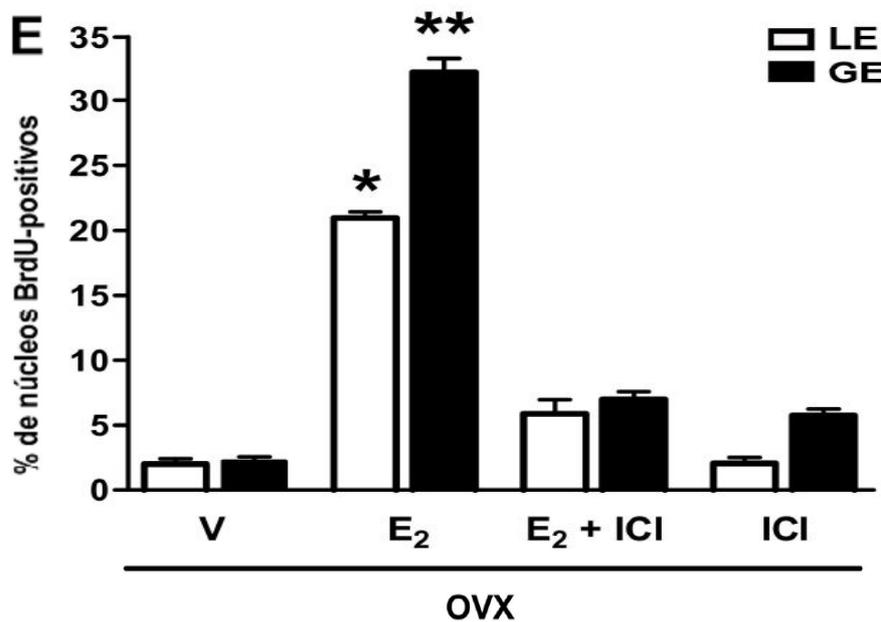
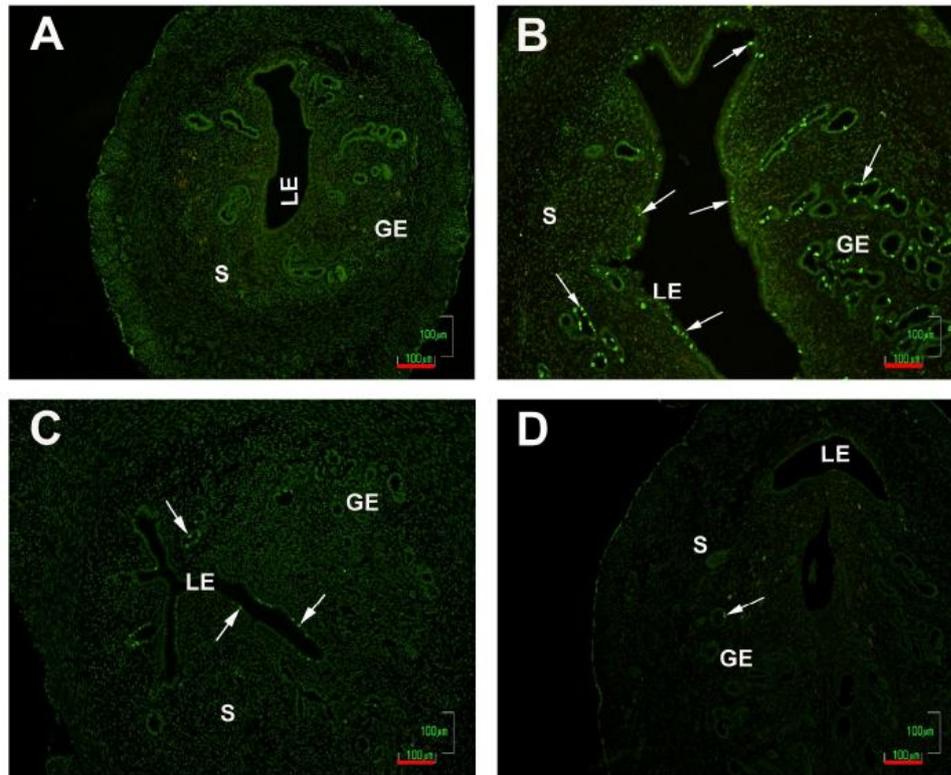


Figura 11. ICI 182,780 bloquea la síntesis de ADN en los epitelios uterinos luminal y glandular de ratas ovx tratadas con E₂. La proliferación de los epitelios uterinos fue medida mediante la incorporación de BrdU en ratas ovx después de uno de los siguientes tratamientos (A) vehículo, (B) E₂ (C) E₂ + ICI 182,780 (D) ICI 182,780. Las flechas indican núcleos positivos para la incorporación de BrdU. (E) Cuantificación de la incorporación de BrdU en los epitelios uterinos después de los tratamientos mostrados en el eje de las X. Barras blancas, LE; Barras negras, GE. Los resultados se expresan como la media \pm ESM de 4 animales estudiados por tratamiento. En E * $p < 0.001$ comparado con los otros tratamientos estudiados en LE, ** $p < 0.001$ comparados con los otros tratamientos estudiados en GE. LE, epitelio luminal; GE, epitelio glandular; S, estroma; V, vehículo; E₂, estradiol. Barra= 100 μ m

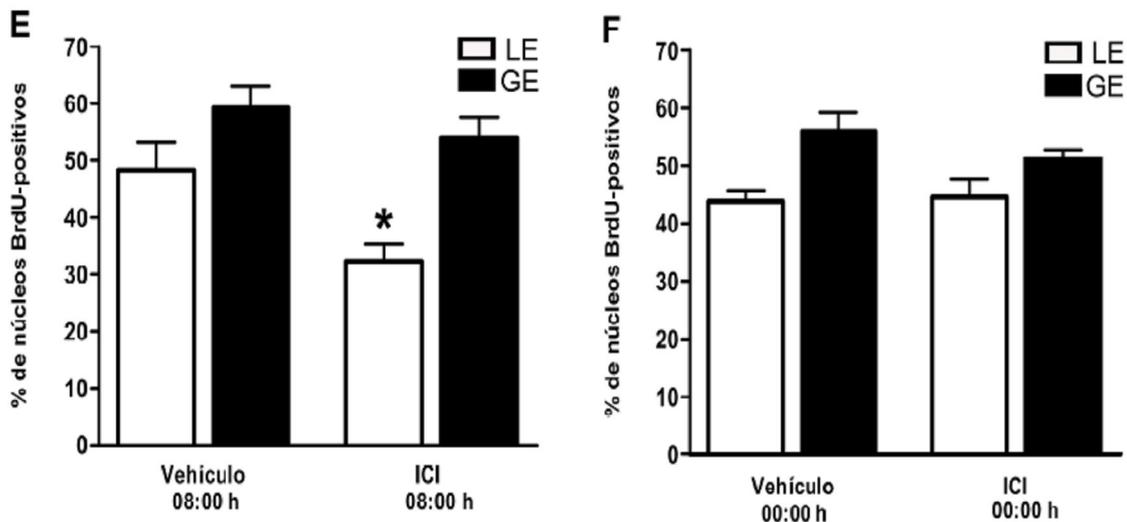
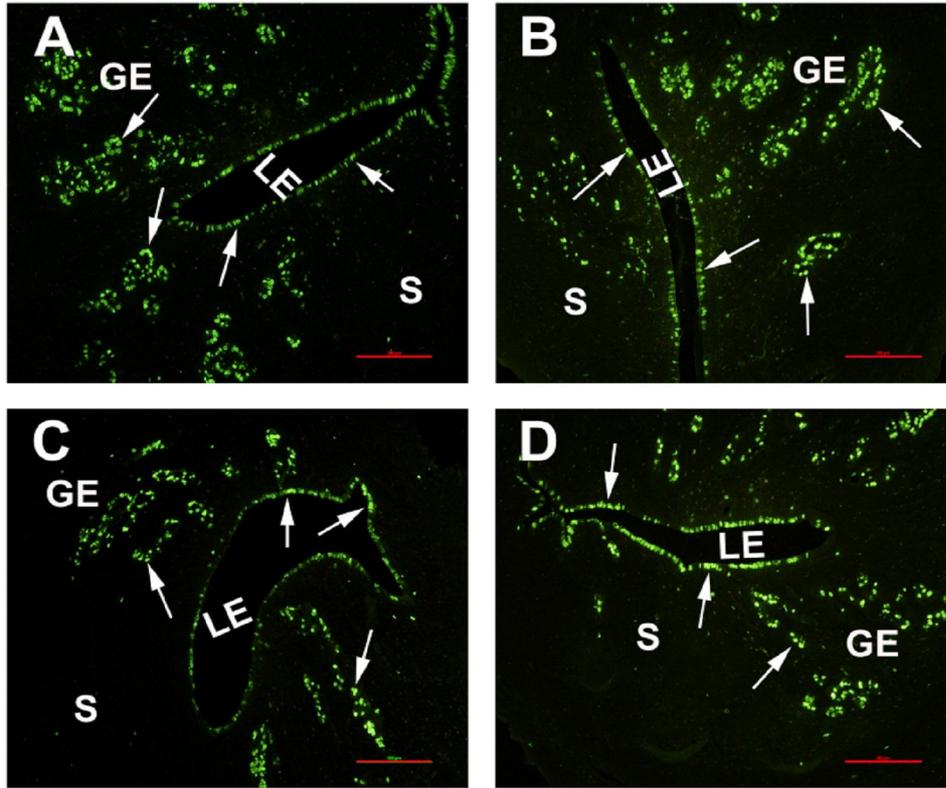


Figura 12. Proliferación de los epitelios luminal y glandular de la rata después del tratamiento con ICI 182,780 en animales durante el ciclo estral. La proliferación de los epitelios uterinos fue medida mediante la incorporación de BrdU en ratas tratadas con ICI 182,780 en cada uno de los tiempos estudiados. (A) Ratas tratadas con vehículo ó (B) ICI 182,780 a las 08:00 h del proestro y sacrificadas a las 13:00 h del metaestro y (C) ratas tratadas con vehículo ó (D) ICI 182,780 a las 00:00 h del estro y sacrificadas a las 13:00 h del metaestro. Las flechas indican núcleos positivos para la incorporación de BrdU. (E-F) Cuantificación de la incorporación de BrdU en los epitelios uterinos después de los tratamientos mostrados en el eje de las X. Barras blancas, LE; Barras negras, GE. Los resultados se expresan como la media \pm ESM de 4 animales estudiados por tratamiento. En E $*p < 0.05$ comparado con el LE del vehículo 08:00 h. LE, epitelio luminal; GE, epitelio glandular; S, estroma. Barra= 200 μ m.

Cambios inducidos por ICI 182,780 sobre el peso húmedo del útero en ratas ovx tratadas con E₂ y en ratas intactas durante el ciclo estral

El aumento en el peso húmedo del útero es una clásica respuesta estrogénica que ha sido ampliamente utilizada como un ensayo biológico para la caracterización de compuestos antiestrogénicos. Como se puede observar, en ratas ovx el tratamiento con E₂ induce un incremento significativo en el peso húmedo del útero (210.80 ± 14.7 mg) en comparación con los animales ovx tratados con vehículo (120.15 ± 7.1 mg). En contraste, el tratamiento con el antagonista estrogénico ICI, induce una reducción del 28% ($p < 0.01$) (151.55 ± 5.6 mg) en el peso húmedo del útero inducido por E₂ (Fig. 13). Sin embargo, cuando se administra solo el ICI, este no tiene ningún efecto sobre el peso húmedo del útero de ratas ovx (111.80 ± 2.3 mg). Estos resultados sugieren que ICI no presenta actividad agonista estrogénica sobre el útero y bloquea el efecto del E₂ sobre el peso húmedo del útero. Por otro lado, el peso húmedo del útero de animales intactos tratados con ICI a las 08:00 h del proestro y sacrificadas a las 13:00 h del metaestro fue significativamente menor (119.1 ± 6.8 mg) al observado en ratas intactas tratadas con vehículo (151.1 ± 13.5 mg), mostrando una reducción del 21% del peso húmedo del útero (Fig. 14). Sin embargo, cuando el ICI se administró a las 00:00 h del estro, el antagonista estrogénico no tuvo ningún efecto sobre el peso húmedo del útero (143.02 ± 30.8 mg) en comparación con ratas intactas tratadas con vehículo a las 00:00 h del estro (150.05 ± 0.8 mg) (Fig.14).

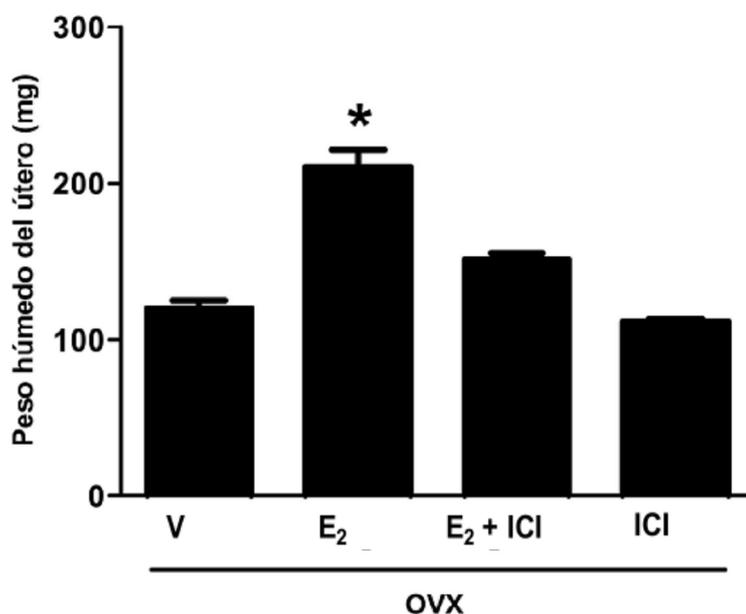


Figura 13. ICI 182,780 reduce el peso húmedo del útero en animales ovx tratados con E₂. Peso húmedo del útero de animales ovx tratados con vehículo (V), estradiol (E₂), E₂ + ICI 182,780 (E₂ + ICI) o ICI 182,780 (ICI). Los resultados se expresan como la media \pm ESM de 4 animales estudiados por tratamiento. * $p < 0.01$ comparado con los otros tratamientos estudiados.

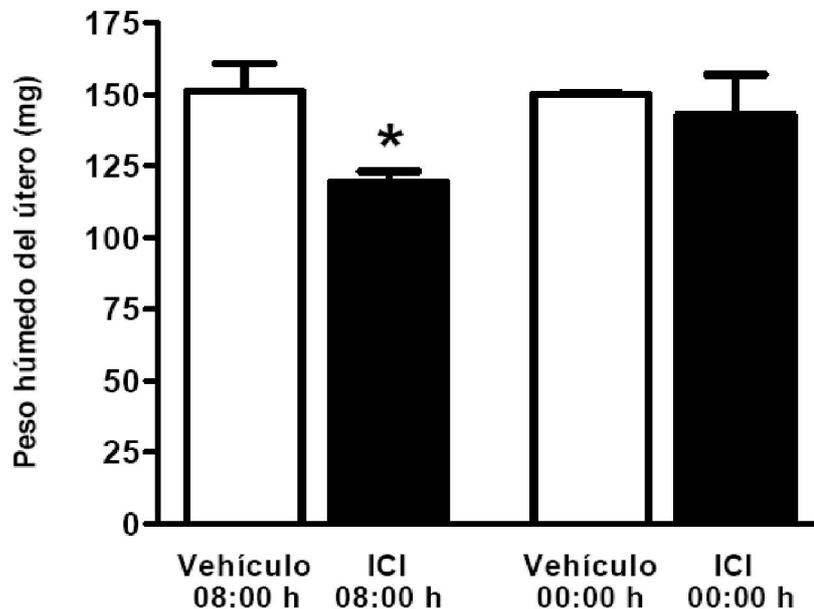


Figura 14. Efecto de ICI 182,780 sobre el peso húmedo del útero de ratas intactas durante el ciclo estral. Peso húmedo del útero de ratas tratadas con vehículo o ICI 182,780 a las 08:00 h del proestro y vehículo o ICI 182,780 a las 00:00 h del estro. Todos los animales fueron sacrificados a las 13:00 h del metaestro. Los resultados se expresan como la media \pm ESM de 4 animales estudiados por tratamiento. * $p < 0.05$ comparado con el vehículo 08:00 h.

Efecto de ICI 182,780 sobre la expresión de la proteína RE- α en animales ovx tratados con E₂ y en animales intactos durante el ciclo estral

Los niveles de proteína del RE- α en el útero de animales ovx tratados con E₂ y de animales intactos durante el ciclo estral fueron evaluados mediante western blot después del tratamiento con ICI. El útero de ratas ovx tratadas con vehículo presentaron los niveles más altos de expresión del RE- α (Fig. 15A y 15B). Así mismo, se midió el efecto del E₂ sobre su propio receptor, en donde se observó que los niveles del RE- α disminuyen 27% del valor observado en ratas ovx tratadas con vehículo. En el útero de ratas ovx, el cotratamiento con ICI + E₂ induce una disminución del 90% de los niveles totales de proteína del RE- α comparados con el tratamiento con E₂ (Fig. 15A y 15B). Por otra parte, en animales ovx tratados solo con ICI se observó que los niveles de proteína del RE- α también disminuyen un 90% del valor observado en ratas ovx tratadas con vehículo (Fig. 15A y 15B). De forma interesante, cuando los niveles del RE- α se midieron en el útero de animales intactos después de la administración de ICI a los dos diferentes tiempos estudiados durante el ciclo estral (08:00 h del proestro y 00:00 h del estro), se observó 74% y 78% de inhibición en los niveles de la proteína del RE- α comparados con el observado en animales tratados con vehículo (Fig. 15C y 15D).

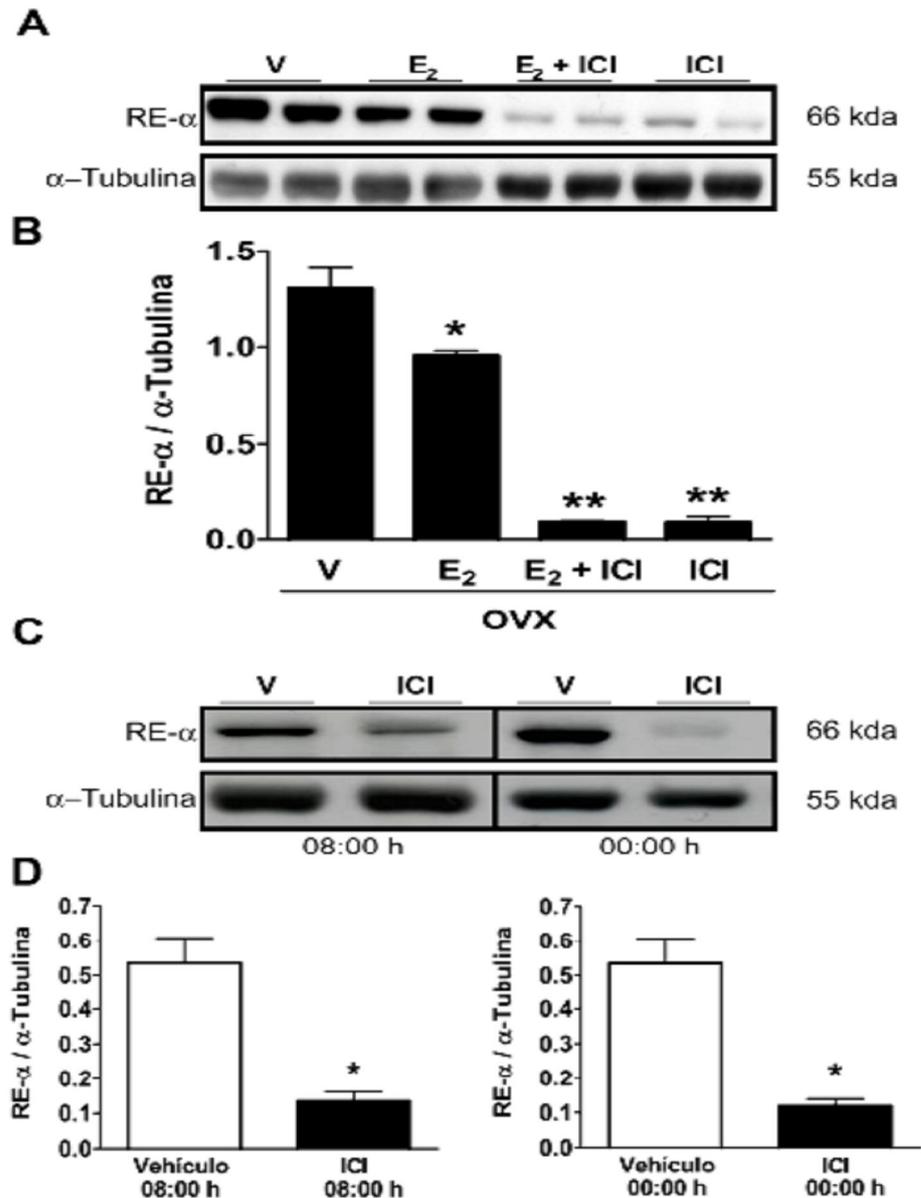


Figura 15. Inhibición de la expresión del RE- α por el tratamiento con ICI en el útero de animales ovx tratados con E₂ y en animales intactos. (A) Western blot representativo de la expresión del RE- α en el útero de ratas ovx después de uno de los siguientes tratamientos: vehículo control (V), estradiol (E₂), E₂ + ICI 182,780 (E₂ + ICI) ó ICI 182,780 (ICI). α -tubulina se utilizó como un control de carga de proteína total. (B) Análisis densitométrico del efecto de cada uno de los tratamientos indicados previamente sobre la expresión del RE- α normalizado respecto al de α -tubulina en el útero de ratas ovx. (C) Western blot representativo del RE- α en el útero de ratas durante el ciclo estral después de uno de los siguientes tratamientos: vehículo (V) ó ICI 182,780 (ICI) administrado a las 08:00 h del proestro y vehículo (V) ó ICI 182,780 (ICI) administrado a las 00:00 h del estro. Todos los animales fueron sacrificados a las 13:00 h del metaestro. α -tubulina se utilizó como un control de carga de proteína total. (D) Análisis densitométrico del efecto de cada uno de los tratamientos indicados previamente sobre la expresión de RE- α normalizado respecto al de α -tubulina en el útero de ratas durante el ciclo estral. En A y B los resultados se expresan como la media \pm ESM de 4 animales estudiados por tratamiento. En B * p <0.05 comparado con los otros tratamientos estudiados y ** p <0.01 comparado con V y E₂. En D * p <0.01 comparado con su respectivo vehículo.

Efecto de ICI 182,780 sobre la expresión de la proteína RP en animales ovx tratados con E₂ y en animales intactos durante el ciclo estral

Para determinar si los niveles del RP son afectados como consecuencia de la regulación a la baja del RE- α inducida por el ICI en animales ovx y durante el ciclo estral, se analizó mediante western blot los niveles uterinos del RP después del tratamiento con ICI. El análisis del western blot de proteína total de útero de ratas ovx muestra que la expresión de RP-A y RP-B, aunque es detectable, es mínima en ratas ovx tratadas con vehículo (Fig. 16A). Como se ha reportado, en el útero de animales ovx tratados con E₂ se observó un aumento en la expresión de ambas isoformas del RP. En cambio, el cotratamiento con el antagonista estrogénico ICI + E₂ disminuyó la expresión del RP inducida por el E₂ en el útero de ratas ovx (Fig. 16A). En el útero de ratas intactas tratadas con vehículo, aunque la expresión de RP-A es mayor a la de RP-B, la expresión de ambas isoformas es mínima en el día de metaestro (Fig. 16B). Contrario a lo observado en ratas ovx, en animales intactos los niveles de expresión uterina del RP-A y RP-B no fueron afectados por la administración de ICI antes del pico de E₂ (08:00 h del proestro) ni cuando se administró 24 h antes de que se inicie la proliferación celular uterina (00:00 h del estro) (Fig. 16B).

Expresión y localización de ciclina D1 en el útero de animales intactos durante el ciclo estral después del tratamiento con ICI

Para determinar el efecto de ICI sobre la expresión de ciclina D1 en el útero de animales intactos, se evaluó el efecto de este antiestrógeno sobre la localización y los niveles de expresión de la proteína ciclina D1 a las 13:00 h del metaestro. El tratamiento con ICI (a las 08:00 h del proestro ó a las 00:00 h del estro) no tuvo efecto sobre la expresión protéica de ciclina D1 (Fig. 17A-C). Sin embargo, en ambos tratamientos experimentales con ICI, se observó una marcada localización nuclear de ciclina D1 en los epitelios luminal y glandular del útero comparado con las ratas tratadas con vehículo (Fig. 18).

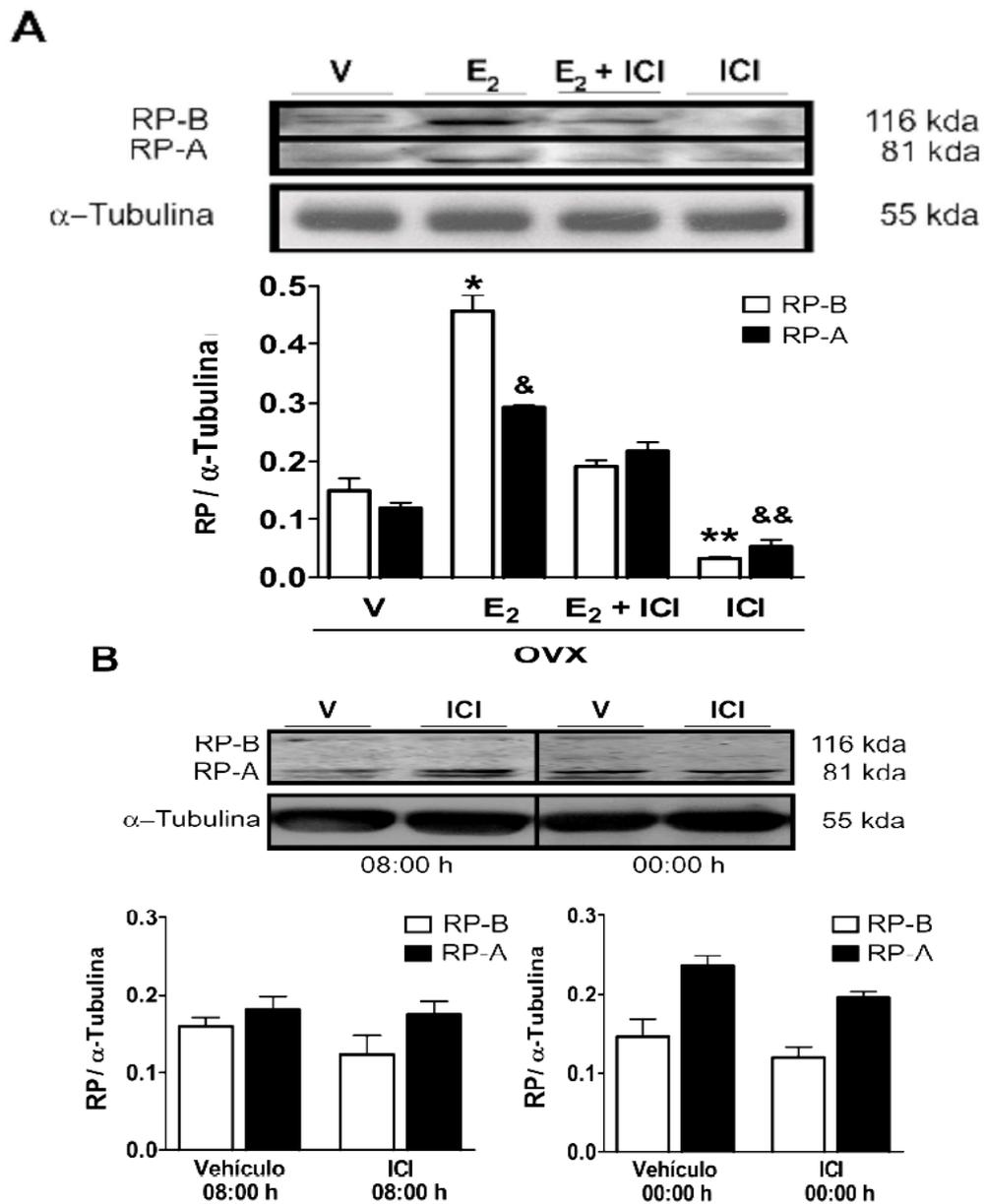


Figura 16. La inhibición del RE- α inducida por el tratamiento con ICI afecta la expresión del RP en el útero de ratas ovx tratadas con E₂ pero no durante el ciclo estral. (A) Western blot representativo de RP en el útero de ratas ovx después de uno de los siguientes tratamientos: vehículo control (V), estradiol (E₂), E₂ + ICI 182,780 (E₂ + ICI) ó ICI 182,780 (ICI). α -tubulina se utilizó como un control de carga de proteína total. Análisis densitométrico del efecto de cada uno de los tratamientos indicados previamente sobre la expresión del RP normalizado respecto al de α -tubulina. Barras blancas, RP-B; Barras negras, RP-A. * $p < 0.01$ comparado con los otros tratamientos en RP-B, ** $p < 0.05$ comparado con E₂ y E₂ + ICI en RP-B, & $p < 0.05$ comparado con los otros tratamientos estudiados en RP-A y && $p < 0.05$ comparado con V, E₂ y E₂ + ICI en RP-A. (B) Western blot representativo del RP en el útero de ratas durante el ciclo estral después de uno de los siguientes tratamientos: vehículo (V) ó ICI 182,780 (ICI) a las 08:00 h del proestro y vehículo (V) ó ICI 182,780 (ICI) a las 00:00 h del estro. Todos los animales fueron sacrificados a las 13:00 h del metaestro. α -tubulina se utilizó como un control de carga de proteína total. Análisis densitométrico del efecto de cada uno de los tratamientos indicados previamente sobre la expresión de RP normalizado respecto al de α -tubulina en el útero de ratas durante el ciclo estral. Barras blancas, RP-B; barras negras, RP-A. En A y B, los resultados se expresan como la media \pm ESM de 4 animales por tratamiento estudiado.

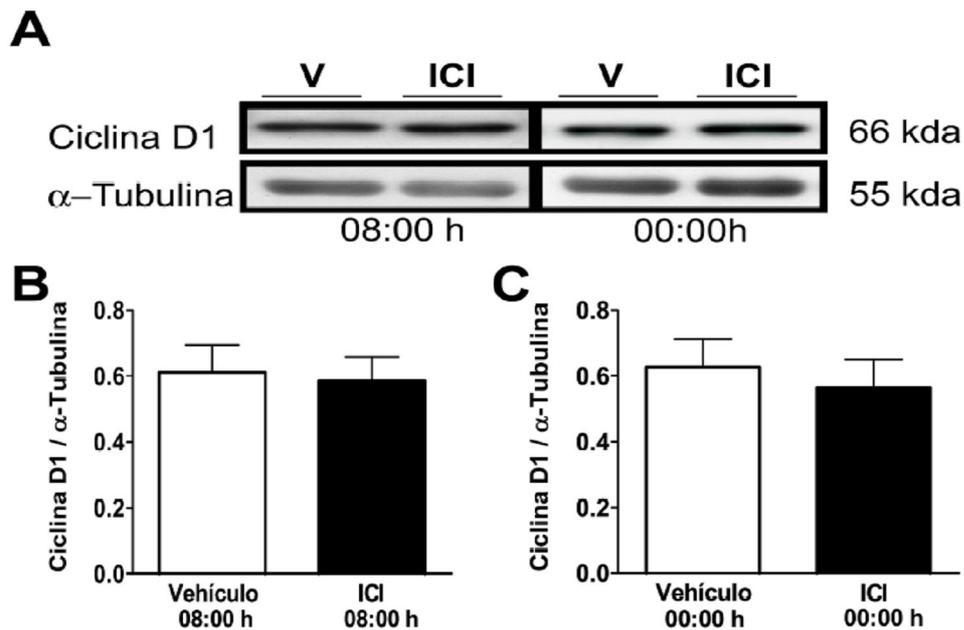


Figura 17. Efecto de ICI 182,780 sobre la expresión de la proteína ciclina D1 en el útero de animales durante el ciclo estral. (A) Western blot representativo de la expresión de ciclina D1 en el útero de animales en metaestro después de uno de los siguientes tratamientos: vehículo (V) ó ICI 182,780 (ICI) administrado a las 08:00 h del proestro y vehículo (V) ó ICI 182,780 (ICI) administrado a las 00:00 h del estro. Todos los animales fueron sacrificados a las 13:00 h del metaestro. α -tubulina se utilizó como un control de carga de proteína total. B-C, Análisis densitométrico del efecto de cada uno de los tratamientos sobre la expresión de ciclina D1 normalizado respecto al de α -tubulina en el útero de ratas durante el ciclo estral. Los resultados se expresan como la media \pm ESM de 4 animales por tratamiento estudiado.

La inhibición de la vía de señalización del RE- α por ICI induce un aumento en la fosforilación de Gsk3- β Ser⁹ en el útero de animales intactos durante el ciclo estral

Para determinar si la vía de señalización del RE- α puede regular la localización celular de ciclina D1 modificando la actividad de Gsk3- β , se analizó el efecto del tratamiento con ICI sobre la localización celular y fosforilación de Gsk3- β en el útero después de los diferentes tratamientos. Los niveles de proteína total de Gsk3- β se mantienen constantes en el útero de ratas bajo ambos tratamientos experimentales con ICI comparada con los niveles observados en ratas tratadas con vehículo (Fig. 19). Sin embargo, los niveles de expresión de la forma fosforilada de Gsk3- β en Ser⁹ fueron mínimos o no se detectaron en animales tratados con vehículo, mientras que en el útero de animales tratados con ICI se observó un incremento en la expresión de la forma fosforilada de la proteína de Gsk3- β Ser⁹ (Fig. 19). Además, se observó una marcada localización nuclear de la forma fosforilada de Gsk3- β Ser⁹ en los epitelios luminal y glandular bajo ambos tratamientos con ICI (08:00 h del proestro y 00:00 h del estro) (Fig. 20), lo cual probablemente determine la localización nuclear de ciclina D1 (Fig. 18).

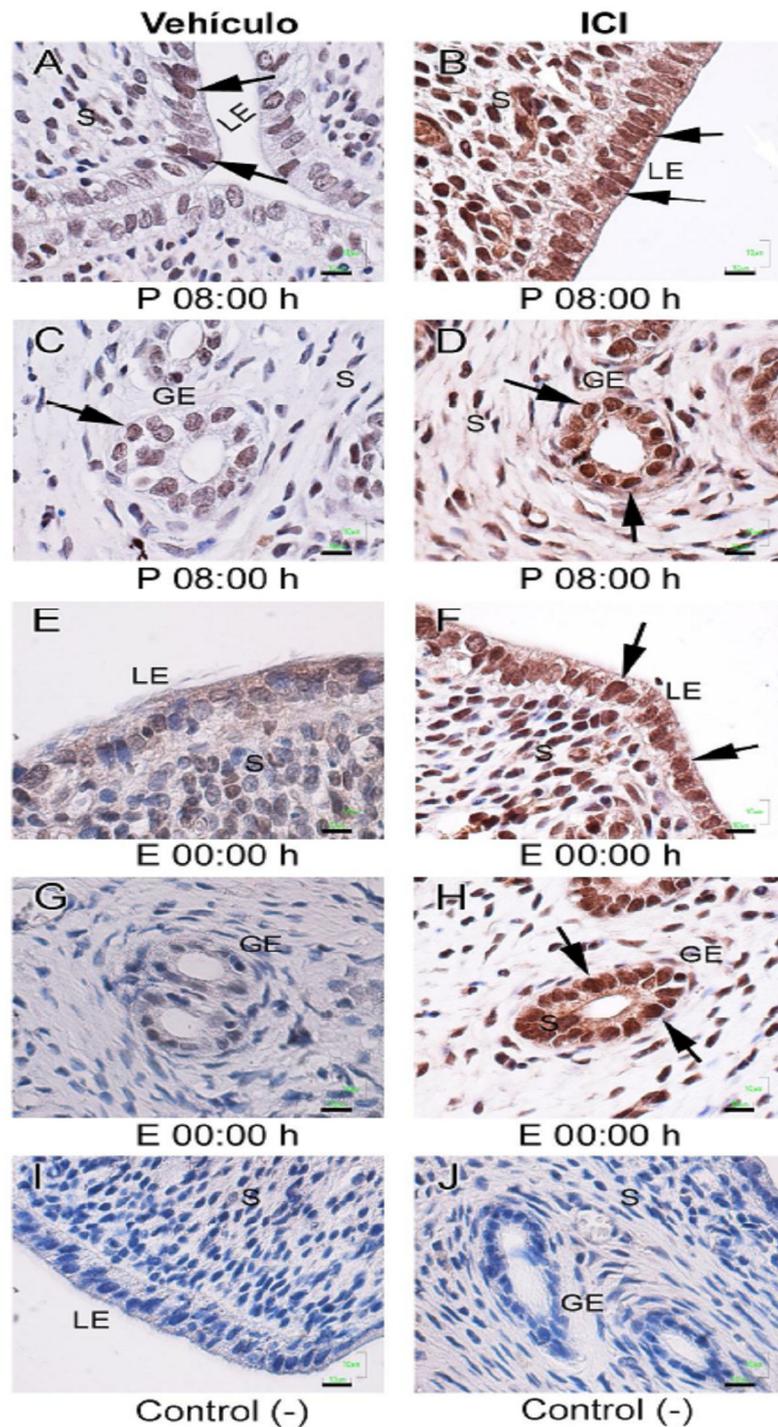


Figura 18. ICI 182,780 induce la localización nuclear de ciclina D1 en el útero de ratas durante el ciclo estral. Se presenta una inmunohistoquímica representativa para ciclina D1 en el útero de ratas durante el ciclo estral después de uno de los siguientes tratamientos: vehículo (A y C) ó ICI 182,780 (B y D) administrado a las 08:00 h del proestro; vehículo (E y G) ó ICI 182,780 (F y H) administrado a las 00:00 h del estro; control negativo (I y J). Todos los animales fueron sacrificados a las 13:00 h del metaestro. Las flechas indican células marcadas. LE, epitelio luminal; GE, epitelio glandular; S, estroma. Barra=10μm.

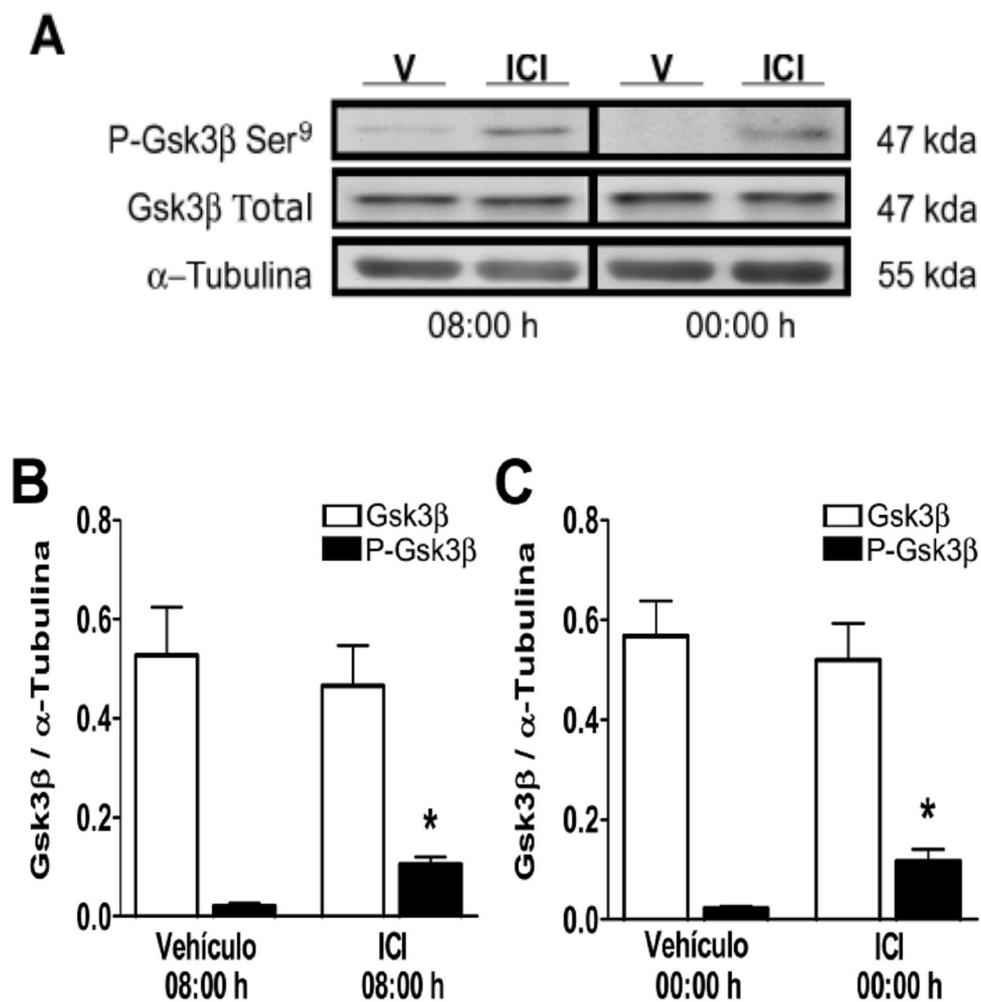


Figura 19. El tratamiento con ICI 182,780 resulta en el incremento de la expresión de P-Gsk3-β en el útero de ratas durante el ciclo estral. (A) Western blot representativo de la expresión de Gsk3-β total y P-Gsk3-β Ser⁹ en el útero de animales en metaestro después de uno de los siguientes tratamientos: vehículo (V) ó ICI 182,780 (ICI) administrado a las 08:00 h del proestro y vehículo (V) ó ICI 182,780 (ICI) administrado a las 00:00 h del estro. α-tubulina se utilizó como un control de carga de proteína total. Todos los animales fueron sacrificados a las 13:00 h del metaestro. B-C, Análisis densitométrico del efecto de cada uno de los tratamientos sobre la expresión de Gsk3-β total y P-Gsk3-β Ser⁹ normalizado respecto al de α-tubulina. Barras blancas, Gsk3-β total; barras negras, P-Gsk3-β. Los resultados se expresan como la media ± ESM de 4 animales por tratamiento estudiado. En B *p< 0.05 comparado con vehículo 08:00h en P-Gsk3-β. En C *p<0.05 comparado con vehículo 00:00 h en P-Gsk3-β.

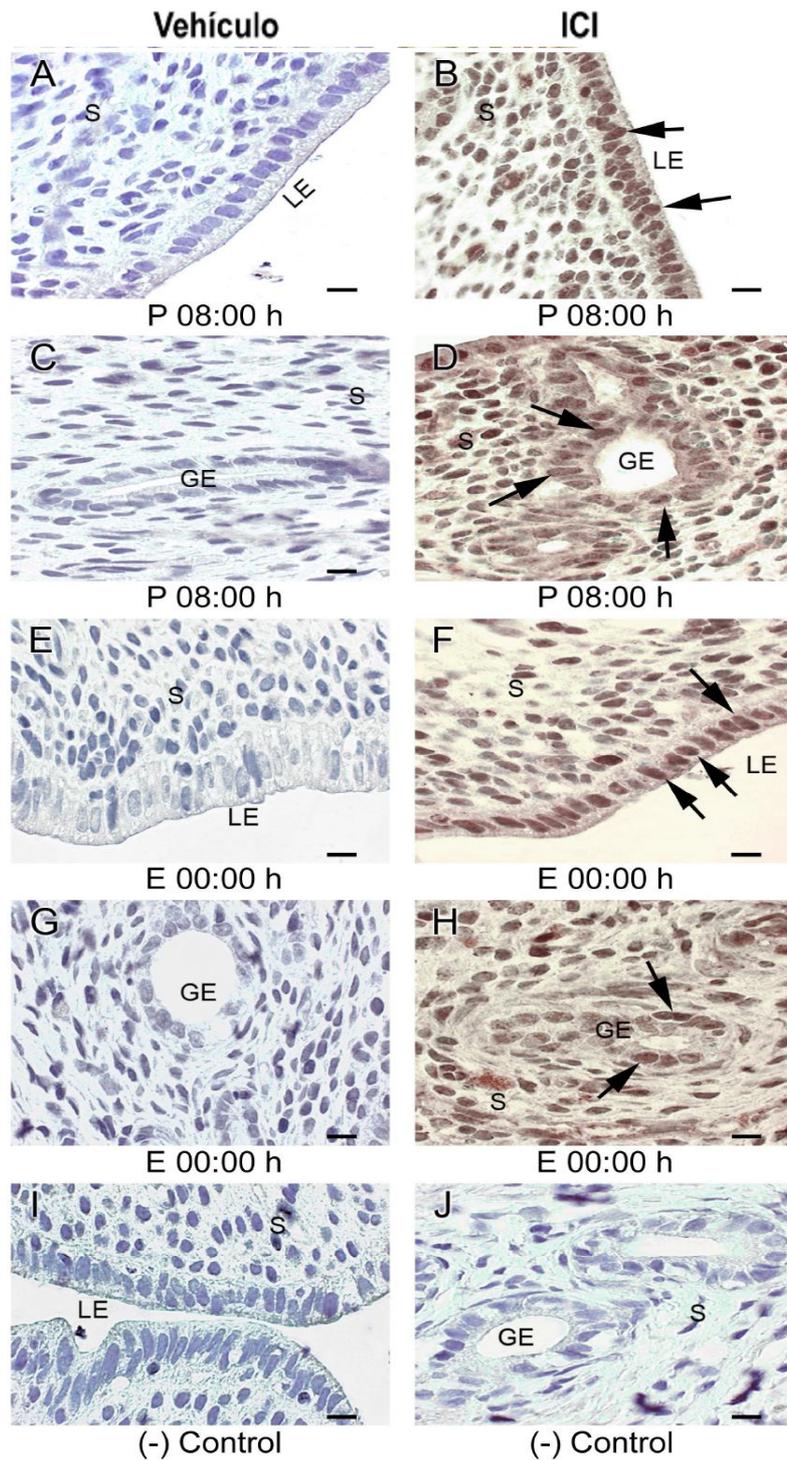


Figura 20. ICI 182,780 induce la localización nuclear de p-Gsk3- β en el útero de ratas durante el ciclo estral. Se presenta una inmunohistoquímica representativa para p-Gsk3- β Ser⁹ en el útero de ratas durante el ciclo estral después de uno de los siguientes tratamientos: vehículo (A y C) ó ICI 182,780 (B y D) administrado a las 08:00 h del proestro; vehículo (E y G) ó ICI 182,780 (F y H) administrado a las 00:00 h del estro; control negativo (I y J). Todos los animales fueron sacrificados a las 13:00 h del metaestro. Las flechas indican células marcadas. LE, epitelio luminal; GE, epitelio glandular; S, estroma. Barra=10 μ m.

La expresión de la forma fosforilada de Akt en el útero de animales durante el ciclo estral es afectada por el antagonista estrogénico

Se sabe que Gsk3- β es un blanco río abajo de la vía de señalización de PI3k/Akt. Para investigar los niveles de expresión de Akt fosforilado inducido por los estrógenos y su inhibición por ICI, se determinó la expresión de Akt bajo los diferentes tratamientos. Los resultados indican que bajo todos los tratamientos previamente descritos, la expresión de Akt total no cambia significativamente (Fig. 21). En ratas intactas, el tratamiento con ICI a las 08:00 h del proestro induce una disminución significativa en la expresión de la forma fosforilada de Akt en Ser⁴⁷³ comparada con lo observado en ratas tratadas con vehículo. Sin embargo, cuando el ICI se administró a las 00:00 h del estro, no se observó ningún efecto sobre los niveles de expresión de la forma fosforilada de Akt en Ser⁴⁷³ comparado con lo observado en ratas tratadas con vehículo (Fig. 21).

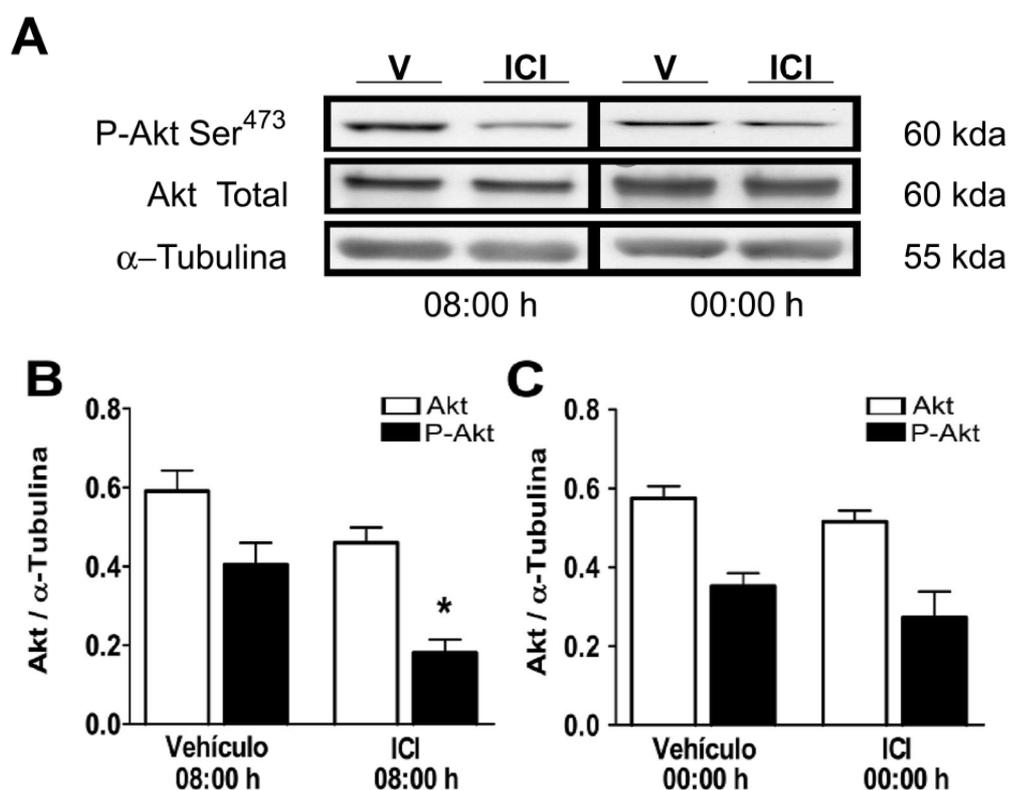


Figura 21. Cambios en la fosforilación de Akt en el útero de ratas durante el ciclo estral después del tratamiento con ICI 182,780. (A) Western blot representativo de la expresión de Akt total y P-Akt Ser⁴⁷³ en el útero de animales en metaestro después de uno de los siguientes tratamientos: vehículo (V) ó ICI 182,780 (ICI) administrado a las 08:00 h del proestro y vehículo (V) ó ICI 182,780 (ICI) administrado a las 00:00 h del estro. α -tubulina se utilizó como un control de carga de proteína total. Todos los animales fueron sacrificados a las 13:00 h del metaestro. B-C, Análisis densitométrico del efecto de cada uno de los tratamientos sobre la expresión de Akt total y P-Akt Ser⁴⁷³ normalizado respecto al de α -tubulina en el útero de ratas durante el ciclo estral. Barras blancas, Akt total; barras negras, P-Akt. Los resultados se expresan como la media \pm ESM de 4 animales por tratamiento estudiado. En B * p < 0.01 comparado con vehículo 08:00 h en P-Akt.

Concentración sérica de E₂ y P₄ en animales intactos después de la administración de ICI

Los niveles de E₂ y P₄ fueron determinados en todos los animales usados. De forma interesante se observó que ambos tratamientos con ICI (08:00 h del proestro y 00:00 h del estro) inducen un aumento significativo en los niveles de E₂ y P₄ comparado con los niveles observados en los animales tratados con vehículo (Tabla 4).

Tabla 4
Concentración sérica de E₂ y P₄ en animales en metaestro.

| Tratamiento ^a | E ₂ pg/mL (pmol/L) | P ₄ ng/mL (nmol/L) |
|--------------------------|--------------------------------|-------------------------------|
| Vehículo 08:00 h | 24.5 ± 2.05 (89.94 ± 7.53) | 15.0 ± 1.91 (47.70 ± 6.07) |
| ICI 08:00 h | 31.2 ± 0.52* (114.54 ± 1.9) | 25.0 ± 6.50 (79.5 ± 20.67) |
| Vehículo 00:00 h | 23.2 ± 1.87 (85.17 ± 6.86) | 18.6 ± 5.14 (59.15 ± 16.35) |
| ICI 00:00 h | 41.6 ± 7.26** (152.71 ± 26.65) | 31.7 ± 6.52* (100.80 ± 20.73) |

^aTodos los animales fueron sacrificados a las 13:00 h del metaestro. Los niveles hormonales fueron determinados por RIA. Los resultados son expresados como la media ± ESM de los valores obtenidos de 4 animales por tratamiento. E₂, estradiol; P₄, progesterona. En E₂ *p < 0.05 comparado con vehículo 08:00 h y **p < 0.05 comparado con vehículo 00:00 h. En P₄ *p < 0.05 comparado con vehículo 00:00 h.

Discusión

El útero de la rata es un tejido blanco para la acción de hormonas esteroides. Uno de los principales efectos de los estrógenos sobre este órgano es la inducción de la proliferación celular. Es bien conocido que la concentración de estas hormonas esteroides varía a lo largo del ciclo estral, lo cual induce cambios cíclicos en la estructura y función del útero. A pesar de que los mecanismos moleculares por los cuales las hormonas esteroides inducen la proliferación celular del endometrio uterino ha sido ampliamente estudiado en animales ovx (Clark *et al.*, 1971; Kaye *et al.*, 1971; Tachi *et al.*, 1972; Kirkland *et al.*, 1979; Murphy *et al.*, 1987; Altucci *et al.*, 1997; Gunin, 1997; Tong y Pollard, 1999; Rider *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2005; Kazi *et al.*, 2009), pocos estudios se han realizados bajo condiciones fisiológicas, como lo es el ciclo estral (Bertalanffy y Lau, 1963; Marcus, 1974; Burroughs *et al.*, 2000; Mendoza-Rodríguez *et al.*, 2003; Dery *et al.*, 2003). Por lo tanto, el útero de la rata durante el ciclo estral representa un excelente modelo para estudiar, en condiciones fisiológicas, los mecanismos moleculares por los que las hormonas esteroides regulan la proliferación celular uterina.

En el presente estudio se determinó la proliferación celular de los epitelios luminal y glandular del útero de la rata y su correlación con la expresión del RE- α , c-Fos, ciclina D1, ciclina D3, Cdk4 y Cdk6 durante la transición estro-metaestro del ciclo estral. Además, se evaluó el efecto de la administración de ICI, antagonista estrogénico, sobre la proliferación celular en ambos epitelios uterinos, el peso húmedo del útero, la expresión del RE- α y del RP en ratas ovx tratadas con E₂ y ratas intactas durante el ciclo estral, así como el efecto de ICI sobre la expresión de ciclina D1, Akt y Gsk3- β como parte de las moléculas que participan en la cascada de eventos que inducen la proliferación celular en el epitelio uterino de la rata durante el ciclo estral.

Proliferación de los epitelios uterinos durante la transición estro-metaestro del ciclo estral de la rata

Se sabe que la homeostasis del tejido uterino resulta de un balance entre la proliferación, diferenciación y muerte celular por apoptosis. Se ha establecido que durante el ciclo estral de la rata, 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 mediante la medición de la actividad mitótica uterina e incorporación de BrdU a las células uterinas (Bertalanffy y Lau, 1963; Leroy *et al.*, 1969; Marcus, 1974; Burroughs *et al.*, 2000; Mendoza-Rodríguez *et al.* 2003), sin embargo, estos estudios han sido realizados cada 24 h abarcando todas las etapas del ciclo estral por lo que no se conoce cuándo y en qué epitelio uterino comienza la proliferación celular. En este estudio, mediante el ensayo de incorporación de BrdU a las células como índice de síntesis de ADN, se determinó el inicio de la

proliferación celular del epitelio uterino de la rata durante la transición estro-metaestro. Nuestros resultados indican que los niveles mínimos de proliferación celular en los epitelios glandular y luminal ocurren durante el estro. Estos resultados concuerdan con estudios previos en donde reportan que ambos epitelios uterinos presentan una mínima actividad proliferativa, al igual que en nuestro estudio, durante el estro, etapa en la cual mediante datos de microscopía electrónica y TUNEL se ha reportado que se presenta el máximo índice apoptótico de ambos epitelios uterinos (Spornitz *et al.*, 1994; Burroughs *et al.*, 2000; Mendoza-Rodríguez *et al.*, 2002). Durante la transición estro-metaestro, los niveles máximos de proliferación celular en los epitelios glandular y luminal ocurren durante el metaestro (03:00 h y 13:00 h del metaestro, respectivamente) (Figs. 1 y 2). Estos resultados concuerdan con lo reportado por Burroughs *et al.*, (2000) y Mendoza-Rodríguez, *et al.*, (2003) los cuales observan una máxima proliferación celular de los epitelios uterinos durante la etapa del metaestro.

Nuestros resultados confirman y extienden los datos de proliferación celular uterina publicados recientemente, ya que en este estudio se observó un inicio diferencial de la proliferación celular entre ambos epitelios uterinos de la rata, encontrando que el epitelio glandular fue el primero en presentar núcleos BrdU positivos, teniendo un 30% de las células del epitelio glandular en la fase S del ciclo celular a las 00:00 h del metaestro, mientras que solo el 10% de las células del epitelio luminal están en la misma fase del ciclo a las 03:00 h del metaestro (Figs. 1 y 2). De forma interesante, durante el ciclo estral los niveles de E₂ en circulación periférica alcanzan su máximo valor en la mañana del proestro (Tabla 3) (Freeman, 1988) y las células epiteliales uterinas inician su proliferación celular durante las primeras horas del metaestro (00:00 h - 03:00 h) (Fig. 2), lo cual ocurre aproximadamente 40 h después de que los niveles de E₂ alcancen su máximo valor. Estos resultados difieren de lo observado en animales ovx tratados con E₂, en donde la proliferación celular de los epitelios uterinos alcanzan su máximo valor 12-24 h después del tratamiento con E₂ (Tachi *et al.*, 1972; Martin *et al.*, 1973; Martin *et al.*, 1976; Quarmby y Korach, 1984), presentando niveles máximos de esta hormona en circulación periférica de 1 a 6 h después del tratamiento, dependiendo la vía de administración (Barton *et al.*, 1988). Estas diferencias en el tiempo de respuesta, sugieren que en condiciones fisiológicas la acción mitogénica del E₂ puede involucrar diferentes cascadas de señalización.

Por otra parte, es importante mencionar que en ambos epitelios uterinos se identificaron grupos de células marcadas con BrdU rodeados de grupos de células sin marca, sugiriendo la presencia de un nicho de células epiteliales stem like/ progenitoras el cual puede ser el responsable de la renovación endometrial, de manera similar a las que han sido previamente observadas en las células del endometrio del ratón (Li y Xie, 2005; Gargett y Chan, 2006).

Patrón de expresión del RE- α , c-Fos, Ciclina D1, Ciclina D3, Cdk4 y Cdk6 durante la transición estro-metaestro del ciclo estral de la rata

Se ha demostrado que en el útero de ratas ovx, el E₂ induce la proliferación celular uterina por medio de la inducción de factores de transcripción los cuales incluyen diversos proto-oncogenes (Travers y Knowler 1987; Murphy *et al.*, 1987; Weisz y Bresciani, 1988; Loose-Mitchell *et al.*, 1988; Weisz *et al.*, 1990; Papa *et al.*, 1991; Nephew *et al.*, 1993; Webb *et al.*, 1993; Bigsby y Li, 1994; Nephew *et al.*, 1995). La inducción de c-Fos por el E₂ en el útero de ratas ovx ha sido demostrada por diferentes metodologías como son “Northern Blot” (Weisz y Bresciani, 1988; Loose-Mitchell *et al.*, 1988; Bigsby y Li, 1994), inmunohistoquímica (Papa *et al.*, 1991) e hibridación *in situ* (Nephew *et al.*, 1995). Diversos estudios han demostrado los efectos del E₂ sobre la expresión y actividad de ciclinas y Cdks en el útero de ratas ovx. Sin embargo, 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 ovx y los intactos responden de manera diferente a las hormonas esteroides (Molnar y Murphy, 1994; Nandha *et al.*, 1999; Cameron *et al.*, 2002). Por otro lado, se sabe que en la mayoría de los mamíferos la actividad del RE- α en el útero y en el oviducto es regulada por cambios cíclicos en los niveles hormonales (Kraus y Katzenellenbogen, 1993; Sahlin y Eriksson, 1996; Wang *et al.*, 1999; Nephew *et al.*, 2000; Stygar *et al.*, 2003). Tomando en cuenta que durante el ciclo estral se presentan cambios cíclicos en las concentraciones de E₂ y P₄, los cuales inducen variaciones en la proliferación celular del útero, se decidió evaluar el patrón de expresión de moléculas clave en la inducción de la progresión del ciclo celular como son: RE- α , c-Fos, ciclina D1, ciclina D3, Cdk4 y Cdk6 en el útero de la rata durante la transición estro-metaestro del ciclo estral. Nuestros resultados indican que la proliferación epitelial uterina es precedida por una expresión nuclear secuencial de estas proteínas, como se puede observar en las Tablas 1 y 2 y Fig. 9.

Durante el ciclo estral, se ha reportado la localización nuclear de las proteínas del RE- α y c-Fos en ambos epitelios uterinos durante la etapa del estro. Estos niveles de expresión nuclear aumentan en la etapa del metaestro (Mendoza-Rodríguez *et al.*, 2003). Nuestros resultados concuerdan con lo anterior, ya que tanto en el epitelio luminal como en el glandular se detectó la localización del RE- α y c-Fos en el núcleo de las células desde las 13:00 h del estro (Figs. 3, 4, 9 y Tablas 1 y 2) cuando los niveles de E₂ y P₄ son bajos (Tabla 3). Posteriormente, conforme avanzan los tiempos de estudio durante la transición estro-metaestro, se incrementa el número de núcleos positivos para ambas proteínas (RE- α y c-Fos), mientras que los niveles de ambas hormonas también aumentan (Tabla 3). Más aún, es importante mencionar que en el epitelio glandular se observó un mayor número de núcleos inmunopositivos para el RE- α y c-Fos comparado con el epitelio luminal durante las primeras horas de estudio (de 13:00 h a 21:00 h del estro), además de que en el epitelio glandular la localización nuclear de ciclina D1 se detectó desde las 13:00 h

del estro (Figs. 5, 9 y Tabla 2), mientras que la localización nuclear de ciclina D3 se observó a partir de las 17:00 h del estro (Figs. 6, 9 y Tabla 2). En el epitelio luminal, la localización nuclear de ambas ciclinas (D1 y D3) se observó varias horas después, a las 21:00 h del estro (Figs. 5, 6, 9 y Tabla 1). Estas diferencias en el curso temporal de la localización nuclear de las ciclinas pueden ser la causa de que el inicio de la proliferación de ambos epitelios sea distinto, siendo el epitelio glandular el que prolifera primero. Estos resultados concuerdan con los datos reportados por Zhuang y col. (Zhuang *et al.*, 2001) en donde el epitelio glandular de ratas ovx tratadas con E₂ expresan marcadores de la fase S (ciclina A y PCNA) antes que el epitelio luminal mostrando así una ligera diferencia en la cinética de entrada a la fase S del ciclo celular.

Es bien conocido que las ciclinas tipo D son componentes de la maquinaria del ciclo celular que gobiernan la transición de la fase G1 a S en respuesta a señales del medio extracelular. En el caso del útero, se ha establecido que uno de los principales reguladores de la proliferación celular son los estrógenos. La participación de las ciclinas D1 y D3 en la regulación de la proliferación de los epitelios uterinos ha sido estudiada durante muchos años en animales ovx tratados con E₂ (Altucci *et al.*, 1997; Tong y Pollard, 1999; Zhuang *et al.*, 2001). En este modelo, se ha reportado que el tratamiento con E₂ no modifica la concentración celular de la proteína ciclina D1, pero induce su relocalización del citoplasma al núcleo. La expresión nuclear de ciclina D1 ha sido detectada en ambos epitelios uterinos, aunque es más evidente en el epitelio glandular, y su localización nuclear se ha observado (4- 12 h después del tratamiento con E₂) antes de la presencia de marcadores de la fase S del ciclo celular, mientras que la expresión nuclear de ciclina D3 se ha detectado exclusivamente en las células del epitelio luminal (32 h después del tratamiento con E₂), después de la presencia de marcadores de la fase S del ciclo celular, lo que sugiere que estas proteínas probablemente actúen de manera tejido-específica en este modelo de estudio (Zhuang *et al.*, 2001). En concordancia con estos resultados, en este trabajo se observó que en el epitelio luminal, la ciclina D3 fue la primer ciclina que se detectó en el núcleo celular a las 17:00 h del estro, mientras que en el epitelio glandular la ciclina D1 fue la primera en detectarse en el núcleo de las células a las 13:00 h del estro (Fig. 9). No obstante, durante el ciclo estral, se detectó la expresión de ambas ciclinas, D1 y D3, en el núcleo de las células de ambos epitelios uterinos, luminal y glandular, antes de la incorporación de BrdU a las células uterinas (Figs. 5, 6, 9, Tablas 1 y 2). Estos resultados sugieren que a pesar de que la ciclina D3 pueda inducir el inicio de la proliferación celular en el epitelio luminal mientras que la ciclina D1 del epitelio glandular, ambas ciclinas participan en la regulación de la proliferación de los epitelios uterinos durante el ciclo estral. De forma interesante, se observó que la expresión nuclear de ciclina D3 en los epitelios luminal y glandular se da en un periodo de tiempo más corto que el de ciclina D1. Estos resultados sugieren la presencia de un mecanismo de regulación diferente subyacente a la expresión de los genes de ciclina D1 y ciclina D3 en el útero de la rata durante el ciclo

estral lo cual concuerda con lo reportado por Geum y col. en ratones prepúberes cebados con E₂ (Geum et al., 1997).

La ciclina D1 ha sido reconocida como uno de los inductores más importantes de la proliferación celular ya que la amplificación del gen y su sobreexpresión han sido frecuentemente encontrados en diversos tipos de neoplasmas malignos en el humano (Mullany *et al.*, 2008). Las ciclinas tipo D son expresadas diferencialmente en diferentes tejidos e inducen diversos efectos moleculares. Recientemente se ha reportado que tienen una importante participación en diversas rutas metabólicas incluyendo aquellas que involucran los receptores nucleares particularmente PPAR γ , RE, RA y receptor a tiroides, así como funciones mitocondriales y de lipólisis (Coqueret, 2002; Fu *et al.*, 2004; Sakamaki *et al.*, 2006). La expresión de ambas ciclinas, D1 y D3, en los epitelios luminal y glandular introduce una nueva interrogante acerca del papel de estas proteínas en otras funciones celulares, además de la regulación del ciclo celular en el útero, las cuales deben ser investigadas. Nuestros datos respecto al diferente curso temporal de localización nuclear de ciclina D1 y ciclina D3 en ambos epitelios pueden estar en relación a su participación en la progresión del ciclo celular. La expresión nuclear de ciclina D1 es detectada tempranamente en el epitelio glandular por lo que puede iniciar en este epitelio la transición de la fase G1 a S del ciclo celular. Por otra parte, la ciclina D3 es inducida de forma primaria en el epitelio luminal (Fig. 9, Tablas 1 y 2).

La expresión de Cdk4 y Cdk6, subunidades catalíticas de las ciclinas tipo D, fue detectada en el núcleo y citoplasma de ambos epitelios uterinos durante todo el curso temporal estudiado (estro – metaestro). Estos resultados concuerdan, en parte, con lo reportado en estudios previos en animales ovx (Tong y Pollard, 1999), en los cuales ambas Cdks fueron localizadas en el núcleo y citoplasma de las células de ambos epitelios uterinos en ratas ovx y ovx tratadas con E₂. Contrario a nuestros resultados, en ese estudio los niveles de expresión de la proteína de Cdk6 se mantienen elevados durante 15 h después del tratamiento con E₂, mientras que nosotros observamos un ligero descenso en la expresión de Cdk6 desde las 17:00 h del estro hasta las 03:00 h del metaestro (Tabla 1). Así mismo, en el estudio de Tong y Pollard (1999) la expresión nuclear de Cdk4 aumenta en respuesta al tratamiento con E₂, alcanzando un valor máximo a las 4 h después del tratamiento hormonal. En nuestro estudio, no se observaron cambios en la intensidad de la tinción nuclear de estas proteínas, Cdk4 y Cdk6, en ambos epitelios uterinos (Tablas 1 y 2). Se ha reportado que las proteínas Cdk4 y Cdk6 son expresadas de forma marcada y estable en la mayoría de los tipos celulares, por lo que se cree que su regulación está dada a través de la regulación de las ciclinas (Morgan, 1995). Nuestros resultados sugieren que este podría ser el caso de las células epiteliales del útero durante la transición estro-metaestro.

Los resultados indican que hay una correlación positiva entre la expresión secuencial del RE- α , c-Fos, la localización nuclear de ciclinas D, Cdk4, Cdk6, y la progresión del ciclo celular en los epitelios uterinos de la rata durante el ciclo estral. Por otra parte, las diferencias observadas en la localización nuclear, el curso temporal de expresión y los tipos celulares que expresan ambas ciclinas entre condiciones farmacológicas y fisiológicas, sugieren diferentes mecanismos de regulación de la proliferación celular uterina entre ambos modelos experimentales lo que se puede deber al complejo ambiente hormonal, y por ende a una regulación multifactorial de este proceso durante el ciclo estral.

Efecto del tratamiento con ICI, antagonista estrogénico, sobre la proliferación celular y proteínas reguladas por el E₂ en el útero de ratas ovx y durante el ciclo estral

Una de las estrategias para estudiar los mecanismos moleculares involucrados en la proliferación celular de los epitelios uterinos inducida por el E₂, es bloquear la vía de señalización de los estrógenos vía su receptor mediante el uso de antagonistas del RE.

Los resultados de este estudio indican que en el epitelio luminal, pero no en el glandular, hay una menor incorporación de BrdU después de la administración de ICI a las 08:00 h del proestro (Figs. 12B y E). Las diferencias observadas entre los epitelios luminal y glandular concuerdan con los diferentes mecanismos de regulación en estos tipos celulares (Zhuang *et al.*, 2001; Baranda-Avila *et al.*, 2009; Mendoza-Rodriguez *et al.*, 2009). De forma paralela, se observó una disminución significativa en los niveles de proteína total del RE- α del útero y en el peso húmedo del útero (Figs. 14 y 15C); alteraciones en este último sugieren cambios en una variedad de procesos que incluyen alteraciones en la permeabilidad vascular, en la retención de agua, en el tamaño de la célula y en el número de células debido a la proliferación. Estos resultados indican que este tejido es sensible a la actividad estrogénica. Por otra parte, el porcentaje de proliferación celular de los epitelios luminal y glandular (Figs. 12D y F) y el peso húmedo del útero (Fig. 14) no se modificaron por el tratamiento con ICI, cuando éste fue administrado a las 00:00 h del estro (24 h antes de que se inicie la proliferación celular), a pesar de que los niveles totales del RE- α uterino disminuyeron en respuesta a la acción del antiestrógeno (Fig. 15C y 15D). Los diferentes efectos del ICI sobre estos parámetros durante el ciclo estral pueden ser explicados con los distintos periodos de tiempo en el que el útero está bajo la exposición a los altos niveles fisiológicos del E₂ entre ambos esquemas de tratamiento con ICI. Debido a que los niveles de E₂ en suero son máximos en la mañana del proestro, el útero de los animales a los que se les administró ICI a las 00:00 h del estro fueron expuestos a este pico de E₂ aproximadamente 16 h antes de que el efecto de la hormona fuera bloqueada por el ICI. De forma contraria, en el otro grupo experimental, el ICI fue administrado (08:00 h del proestro) antes del pico fisiológico de E₂.

Los estrógenos han sido reconocidos como la principal hormona mitogénica en el tracto reproductivo femenino. Sin embargo, nuestros resultados demuestran que durante el ciclo estral, el tratamiento con ICI solo bloquea el 15% de la proliferación celular del epitelio luminal, no así la del epitelio glandular (Fig. 12E), contrario a lo observado en el modelo farmacológico, en donde el tratamiento con ICI bloquea aproximadamente el 70% de la proliferación celular de ambos epitelios uterinos inducida por el E₂ en el útero de animales ovx (Figs. 10 y 11). Estos datos sugieren la participación de otros factores y vías de señalización adicionales a la del RE- α que pueden modular la proliferación celular bajo condiciones fisiológicas. Se ha reportado que el E₂ induce la proliferación celular en ausencia de los RE clásicos mediante el ERR α (de estrogen related receptor- α) y GPR30 (G protein-coupled receptor 30) (Vivacqua *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2010), los cuales podrían estar participando de manera adicional en el proceso de proliferación celular del útero de la rata durante el ciclo estral. De forma interesante, ambos esquemas experimentales con ICI inducen un incremento significativo en los niveles séricos de E₂ en los animales durante el ciclo estral (Tabla 4), de manera similar a resultados previamente reportados (Sibonga *et al.*, 1998). Estos cambios en los niveles hormonales sugieren posibles alteraciones del eje hipotálamo-hipófisis-gónada (HPO). Sin embargo, diversos estudios reportan que el tratamiento con ICI induce un incremento en los niveles séricos de E₂ sin modificar los niveles séricos de LH, FSH o prolactina (Wakeling *et al.*, 1991; Thomas *et al.*, 1994). Más aún, el efecto de ICI sobre los niveles séricos de E₂ en ratas durante el ciclo estral puede explicar la proliferación celular uterina observada después del tratamiento con ICI. En el útero de ratones, líneas celulares humanas de endometrio y glándula mamaria, el tratamiento tanto con E₂ como con ICI induce la expresión del ERR α de manera independiente al RE- α (Vivacqua *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2010; Yu *et al.*, 2010). Además, se ha demostrado que ambos (E₂ e ICI) inducen la expresión del ERR α a través de GPR30 y pueden mimetizar los efectos del E₂ mediante una vía de señalización no clásica que activa proteínas G y estimula acciones proliferativas que involucran la activación de diversas vías de cinasas, como la PI3k/AKT (Li *et al.*, 2010). Considerando que el tratamiento con ICI durante el ciclo estral no altera la proliferación celular uterina e incrementa los niveles séricos de E₂, los efectos de ICI y E₂ podrían estar mediados por la vía de señalización de GPR30/ERR α durante el ciclo estral.

Es bien sabido que la expresión del gen de RP es regulada por los estrógenos. Se ha reportado que en el útero de diversas especies la expresión del RP es regulado a la alta por el tratamiento con E₂ y a la baja por P₄ (Kraus y Katzenellenbogen, 1993; Ohta *et al.*, 1993). De acuerdo con estas observaciones se detectó un aumento significativo de las isoformas del RP en el útero de ratas ovx tratadas con E₂ (Fig. 16A). Se ha demostrado que la transcripción de genes regulados por el RE- α se inhibe como consecuencia de la disminución de la concentración del RE- α y la inhibición de la transactivación del RE- α por ICI

(Sahlin y Ericsson, 1996; Klotz *et al.*, 2002; Stygar *et al.*, 2003). Como se esperaba, en el útero de ratas ovx, se detectó que el tratamiento con ICI disminuye la expresión del RP inducida por E₂ (Fig. 16A) al disminuir significativamente la expresión de la proteína del RE- α (Fig. 15A y 15B), lo que sugiere que la expresión uterina del RP en ratas ovx es estrógeno y RE- α dependiente. De forma contraria, durante el ciclo estral, se detectó que los niveles de expresión uterina del RP (Fig. 16B) no son modificados por ninguno de los tratamientos con ICI, a pesar de que se observaron bajos niveles de expresión del RE- α después del tratamiento con ICI (Fig. 15C y 15D). El incremento en los niveles de E₂ observado después del tratamiento con ICI (Tabla 4) puede estar equilibrando la expresión del RP ya que se ha demostrado que el E₂ induce la expresión del RP.

Se ha determinado que una de las principales vías de señalización que inducen proliferación en células epiteliales uterinas vía RE- α es AKT/PKB. De forma interesante, se ha establecido una correlación positiva entre la proliferación y el aumento en los niveles proteicos de la forma fosforilada de Akt en el útero de la rata durante el ciclo estral (Dery *et al.*, 2003). En este estudio, se investigó el efecto de ICI sobre la activación de Akt en el útero de ratas intactas encontrando que la administración de ICI a las 8:00 h del proestro induce una marcada disminución en la expresión de la forma fosforilada de Akt en Ser⁴⁷³ comparado con ratas tratadas con vehículo (Fig. 21), lo que sugiere que la activación de Akt es dependiente del RE- α . Estos resultados concuerdan con algunos estudios que demuestran que en diversas líneas celulares el tratamiento con E₂ induce la expresión y activación de Akt (Lengyel *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2005; Gentilini *et al.*, 2007; Kazi *et al.*, 2009). Más aún, datos recientes han demostrado que el complejo E₂-RE- α activa la vía de señalización de PI3k/Akt (Simoncini *et al.*, 2000), además de que en células endometriales de ratones Knock-out para el RE- α , el tratamiento con E₂ no induce la activación de Akt (Klotz *et al.*, 2002), apoyando la idea de que la activación de Akt es dependiente del RE- α . Sin embargo, también se ha reportado que el tratamiento con ICI no inhibe la activación de Akt inducida tanto por E₂ como por IGF-I (Klotz *et al.*, 2002). Resultados similares se observaron en este estudio cuando el tratamiento con ICI se administró a las 00:00 h del estro (Fig. 21). Los diferentes efectos detectados en la activación de Akt entre los dos esquemas de tratamiento con ICI durante el ciclo estral se pueden deber al distinto periodo de tiempo en el que el útero estuvo bajo la exposición a altos niveles fisiológicos del E₂.

Gsk3- β es un blanco río abajo de la vía de señalización de PI3K/Akt. Se ha propuesto que uno de los mecanismos para regular la localización nuclear y activación de ciclina D1 es a través de su fosforilación por Gsk3- β . Gsk3- β se encuentra constitutivamente activa y su actividad es regulada de forma negativa a través de su fosforilación en Ser⁹ (Diehl *et al.*, 1998). El E₂ induce la fosforilación de Gsk3- β en Ser⁹, lo cual ocurre de forma paralela a la activación de Akt (Chen *et al.*, 2005). Contrario a lo reportado, en este trabajo se observó que ambos esquemas de administración del antiestrógeno (ICI a las

08:00 h del proestro ó 00:00 h del estro) induce no solo un aumento en la expresión de la forma fosforilada de Gsk3- β en Ser⁹ (Fig. 19) sino también su localización nuclear (Fig. 20) en las células de los epitelios luminal y glandular del útero de la rata durante el ciclo estral. Más aún, después del tratamiento con ICI se observó la localización nuclear de la ciclina D1 en ambos epitelios uterinos (Fig. 18), resultado que se esperaba debido al estado inhibitorio de Gsk3- β observado después del tratamiento antiestrogénico. Estos hallazgos sugieren que el ICI parece actuar como un modulador de la actividad estrogénica en el útero de la rata durante el ciclo estral, de manera similar a lo reportado en células de osteoblasto y MCF-7 (Sibonga *et al.*, 1998, Frasor *et al.*, 2004).

En conclusión, en el modelo farmacológico de inducción de la proliferación celular del útero de animales ovx tratados con E₂, el ICI se comporta como un antagonista estrogénico puro al inhibir significativamente la expresión del RE- α , la expresión del RP, el incremento en el peso húmedo del útero y la proliferación celular uterina inducida por el E₂. En el modelo fisiológico del útero de la rata durante el ciclo estral, el ICI se comporta como un agonista y antagonista estrogénico. En este modelo, los resultados sugieren que el bloqueo de la vía de señalización del RE- α mediante ICI no fue suficiente para inhibir la expresión del RP y la proliferación celular uterina durante el ciclo estral. Además, el incremento en la localización nuclear tanto de la ciclina D1 como de la forma fosforilada de Gsk3- β en Ser⁹ en los epitelios uterinos de la rata después del tratamiento con ICI sugiere que en condiciones fisiológicas el efecto de los estrógenos sobre estas proteínas no involucra directamente la participación del RE- α . Considerando que existen reportes en donde se ha demostrado que tanto el E₂ como el ICI mimetizan los efectos del E₂ al inducir la expresión del ERR α mediante GPR30 en ausencia de los RE clásicos, es necesario estudiar la participación de la vía de señalización de GPR30/ERR α sobre la proliferación celular uterina durante el ciclo estral de la rata.

Conclusiones

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

1. El inicio de la proliferación celular uterina durante el ciclo estral se observó durante las primeras horas del metaestro (entre las 00:00 y las 03:00 h), lo cual ocurre 40 h después de que los niveles máximos de E₂ en suero fueran detectados.
2. De los epitelios uterinos, el glandular es el primero en presentar proliferación celular a las 21:00 h del estro, mientras que el luminal lo hace 3 h después, a las 00:00 h del metaestro. Los resultados de este estudio indican que la localización nuclear de las proteínas de c-Fos y del RE- α precede a la incorporación de BrdU observada en ambos epitelios uterinos y correlaciona de manera positiva con el inicio diferencial de la proliferación celular, siendo el epitelio glandular el que presenta un mayor número de núcleos inmunopositivos para c-Fos y el RE- α mucho tiempo antes de que se detecte la proliferación en este tipo celular comparado con el epitelio luminal.
3. En este estudio se observó que la localización nuclear de las proteínas ciclina D1 y D3 ocurre en ambos epitelios uterinos. La expresión nuclear de la ciclina D1 precede a la de la ciclina D3 en el epitelio glandular, mientras que en el epitelio luminal la expresión nuclear de ciclina D3 precede a la de ciclina D1.
4. Tanto en el epitelio luminal como en el epitelio glandular la localización nuclear de Cdk4 y Cdk6 se mantuvo constante durante todo el curso temporal estudiado.
5. En el útero de animales ovx se observó que el tratamiento con ICI bloquea la proliferación celular, disminuye la expresión de la proteína del RP y el aumento del peso del útero inducido por el E₂, mientras que en el modelo fisiológico de ratas durante el ciclo estral el tratamiento con ICI no fue suficiente para inhibir la proliferación celular uterina y la expresión del RP. De forma paralela se detectó que en ambos modelos ocurre una disminución en la expresión del RE- α después del tratamiento con ICI, lo que sugiere que en el modelo farmacológico la proliferación celular y la expresión del RP dependen de la vía de señalización del RE- α mientras que en el modelo fisiológico podrían estar participando mecanismos moleculares independientes del RE- α .

6. En el modelo fisiológico de ratas durante el ciclo estral, se observaron efectos tanto estrogénicos como antiestrogénicos después del tratamiento con ICI sobre la expresión uterina de ciclina D1, Gsk3- β y Akt, lo cual sugiere la participación de otras vías de señalización, además de la del RE- α , en la regulación de estas proteínas en el útero de la rata durante el ciclo estral.

Perspectivas

Los resultados de este estudio han demostrado diferencias en el proceso de proliferación celular del útero entre el modelo farmacológico de ratas ovx tratadas con E₂ y el modelo fisiológico de ratas intactas durante el ciclo estral. Mas aún, se ha demostrado una regulación diferencial del proceso de proliferación celular entre el epitelio luminal y el epitelio glandular del útero de la rata durante el ciclo estral. Es por ello que es interesante estudiar cuales son las vías de señalización que inducen que el epitelio glandular comience a proliferar antes que el epitelio luminal. Análisis de microarreglos en combinación con RT-PCR en tiempo real revelarán la expresión diferencial de genes involucrados en la regulación de este proceso entre los epitelios uterinos.

En cuanto a los efectos del tratamiento con ICI sobre la proliferación celular uterina durante el ciclo estral, es importante estudiar cual es el estímulo que promueve este proceso cuando los animales se tratan con el ICI: es el incremento en los niveles de E₂ en suero los que regulan la proliferación celular uterina de manera independiente del RE- α ó si es la propia acción del ICI sobre blancos adicionales que contribuyen a este efecto. Es por ello que un buen candidato es la vía ERR α /GPR30, ya que se ha reportado que tanto ICI como E₂ inducen la expresión de ERR α de manera independiente del RE- α estimulando la proliferación celular que involucran la activación de diversas vías de cinasas, como la de PI3k/Akt.

Referencias

- Alao JP (2007) The regulation of cyclin D1 degradation: roles in cancer development and the potential for therapeutic invention. *Molecular Cancer* 6:24-39.
- 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: 23589-23597.
- Alfinito DP, Chen X, Atherton J, Cosmi S, Deecher CD (2008) ICI 182,780 Penetrates Brain and Hypothalamic Tissue and Has Functional Effects in the Brain after Systemic Dosing. *Endocrinology* 149:5219-5226.
- al-Matubsi HY, Fairclough RJ, Jenkin G (1998) Oestrogenic effects of ICI 182,780, a putative anti-oestrogen, on the secretion of oxytocin and prostaglandin F2 alpha during oestrous cycle in the intact ewe. *Anim Reprod Sci* 51:81-96.
- Altucci L, Addeo R, Cicatiello L (1997) Estrogen induces early and timed activation of cyclin dependent kinases 4, 5 and 6 and increases cyclin messenger ribonucleic acid expression in rat uterus. *Endocrinology* 138:978-984.
- Angel P, Hattori K, Smeal T, Karin M (1988) The jun proto-oncogene is positively autoregulated by its product, Jun/AP-1. *Cell* 55:875-885.
- 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-Wetzell 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* 19:2056-2068.
- Baranda-Avila N, Mendoza-Rodríguez CA, Morimoto S, Langley E, Cerbón M (2009) Molecular mechanism of cell proliferation in rodent uterus during the estrous cycle. *J Steroid Biochem Mol Biol* 113:259-268.
- Barton HA, Andersen ME, Allen BC (1998) Dose-response characteristics of uterine responses in rats exposed to estrogen agonists. *Regul Toxicol Pharmacol* 28:133-149.
- 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* 96:1433-1438.
- Bigsby RM, Li A (1994) Differentially regulated immediate early genes in the rat uterus. *Endocrinology* 134:1820-1826.
- 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.
- Beyer C, Velásquez J, Larson K, Contreras JL (1980) Androgen regulations of the motor copulatory pattern in the male New Zealand white rabbit. *Hormones and Beh* 14:179-190.
- Bishop JM (1987) The molecular genetics of cancer. *Science* 235: 305-311.
- Botz J, Zerfass-Thome K, Spitkovsky D, Delius H, Vogt B, Eilers M, Hatzigeorgiou A, Jansen-Dürr P (1996) Cell cycle regulation of the murine cyclin E gene depends on an E2F binding site in the promoter. *Mol Cell Biol* 16:3401-3409.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.
- Branham WS, Fishman R, Streck RD, Medlock KL, De George JJ, Sheehan DM (1996) ICI 182,780 Inhibits Endogenous Estrogen-Dependent Rat Uterine Growth and Tamoxifen-Induced Developmental Toxicity. *Biol Reprod* 54: 160-167 .
- Brown-Grant K, Exley D, Naftolin F (1970) Peripheral plasma oestradiol and luteinizing hormone concentrations during the oestrus cycle of the rat. *J Endocr* 48:295-296.
- 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* 18:5609-5619.
- Buchanan DL, Setiawan T, Lubahn DB, Taylor JA, Kurita T, Cunha GR, Cooke PS (1999) Tissue compartment-specific estrogen receptor-alpha participation in the mouse uterine epithelial secretory response. *Endocrinology* 140:484-491

- Burroughs 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* 63:1322–1330.
- Butcher RL, Collins WE, Fugo NW (1974) Plasma concentration of LH, FSH, prolactin, progesterone and estradiol-17 β throughout the 4-day estrous cycle of the rat. *Endocrinology* 94:1704–1708.
- Calixto GE, Brailowsky S (1999) Neuroesteroides. Neuromoduladores de la excitabilidad cerebral. *Gac Med Méx* 134: 69–84.
- 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–E146.
- Chen B, Pan H, Zhu L, Deng Y, Pollard JW (2005) Progesterone Inhibits the Estrogen-Induced Phosphoinositide 3-kinase AKT GSK-3 β Cyclin D1 pRB Pathway to Block Uterine Epithelial Cell Proliferation. *Mol Endocrinol* 19:1978–1990.
- Chen J, Jackson PK, Kirschner MW, Dutta A (1995) Separate domains of p21 involved in the inhibition of Cdk kinase and PCNA. *Nature* 374: 386–388.
- Chen YL, Law PY, Loh HH (2005) Inhibition of PI3K/Akt Signaling: An Emerging Paradigm for Targeted Cancer Therapy. *Curr Med Chem Anticancer Agents* 5:575–589.
- Cheskis BJ, Greger JG, Nagpal S, Freedman LP (2007) Signaling by Estrogens. *J Cell Physiol* 213: 610–617.
- 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* 41:523–528.
- Clark BF (1971) The effects of oestrogen and progesterone on uterine cell division and epithelial morphology in spayed, adrenalectomized rats. *J Endocr* 50:527–528.
- Clark AS, Guarraci FA, Megroz AB, Porter DM, Henderson LP (2003) The display of sexual behaviors by female rats administered ICI 182,780. *Horm Behav* 43:454–464.
- Conneely OM, Mulac-Jericevic B, DeMayo F, Lydon JP, O'Malley BW (2002) Reproductive functions of progesterone receptors. *Recent Prog Horm Res* 57:339–355.
- Coqueret O (2002) Linking cyclins to transcriptional control. *Gene* 299:35–55.
- Couse JF, Korach KS (1999) Estrogen Receptor Null Mice: What Have We Learned and Where will they lead us?. *Endocrine Reviews* 20: 358–417.
- Dalkin AC, Paul SJ, Haisenleder DJ, Ortolano GA, Yasin M, Marshall JC (1992) Gonadal steroids effect similar regulation of gonadotrophin subunit mRNA expression in both male and female rats. *J Endocrinol* 132:39–45.
- Dalton S (1992) Cell cycle regulation of the human cdc2 gene. *EMBO J* 11: 1797–1804.
- Dauvois s, White R, Parker MG (1993) The antiestrogen ICI 182780 disrupts estrogen receptor nucleocytoplasmic shuttling. *J Cell Sci* 106:1377–1388.
- DeFriend DJ, Howell A, Nicholson RI, Anderson E, Dowsett M, Mansel RE, Blarney RW, Bundred NJ, Robertson JF, Saunders C, Baum M, Walton P (1994) Investigation of a new pure antiestrogen (ICI 182,780) in women with primary breast cancer. *Cancer Res* 54:408–414.
- Dery MC, Leblanc V, Shooner C, Asselin E (2003) Regulation of Akt expression and phosphorylation by 17 β -estradiol in the rat uterus during estrous cycle. *Reprod Biol Endocrinol* 12:1–47.
- Diehl JA, Cheng M, Roussel MF, Sherr CJ (1998) Glycogen synthase kinase-3 β regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes Dev* 2:3499–3511.
- Diel P (2002) Tissue-specific estrogenic response and molecular mechanisms. *Toxicology Letters* 127: 217–224.
- Dipippo VA, Powers CA (1997) Tamoxifen and ICI 182,780 Interactions with Thyroid Hormone in the Ovariectomized-Thyroidectomized Rat. *J Pharmacol Exp Ther* 281:142–148.
- Doisneau-Sixou SF, Sergio CM, Carroll JS, Hui R, Musgrove EA, Sutherland RL (2003) Estrogen and antiestrogen regulation of cell cycle progression in breast cancer cells. *Endocr Relat Cancer* 10: 179–186

- Dowsett M, Nicholson RI, Pietras RJ (2005) Biological characteristics of the pure antiestrogen fulvestrant: overcoming endocrine resistance. *Breast Cancer Res Treat* 93:S11-S18.
- Duronio V (2008) The life of a cell: apoptosis regulation by the PI3K/PKB pathway. *Biochem J* 415:333-344.
- Edwards DP (2005) Regulation of Signal Transduction Pathways by Estrogen and Progesterone. *Annu Rev Physiol* 67:335-376.
- Eferl R, Wagner EF (2003) AP-1: A double-edged sword in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* 3:859-868.
- Ellmann S, Sticht H, Thiel F, Beckmann MW, Strick R, Strissel PL (2009) Estrogen and progesterone receptors: from molecular structures to clinical targets. *Cell Mol Life Sci* 66:2405-2426.
- Eto I (2000) Molecular cloning and sequence analysis of the promoter region of mouse cyclin D1 gene: implication in phorbol ester-induced tumour promotion. *Cell Prolif* 33:167-187.
- Fawell SE, White R, Hoare S, Sydenham M, Page M, Parker MG (1990) Inhibition of estrogen receptor-DNA binding by the "pure" antiestrogen ICI 164,384 appears to be mediated by impaired receptor dimerization. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:6883-6887.
- Franke TF (2008) PI3K/Akt: getting it right matters. *Oncogene* 27:6473-6488.
- Frasor J, Stossi F, Danes JM, Komm B, Lyttle CR, Katzenellenbogen BS (2004) Selective Estrogen Receptor Modulators: Discrimination of Agonistic versus Antagonistic Activities by Gene Expression Profiling. *Cancer Res* 64:1522-1533.
- Freeman ME (1988) The ovarian cycle of the rat. In: *The Physiology of reproduction*, (E. Knobil y J. Neil, eds.), pp. 1893-1928, Raven Press Ltd., New York.
- Fu M, Wang C, Li Z, Sakamaki T, Pestell RG (2004) Minireview: cyclin D1: normal and abnormal functions. *Endocrinology* 145:5439-5447.
- Fu XD, Simoncini T (2008) Extra-nuclear Signaling of Estrogen Receptors. *IUBMB Life* 60: 502-510.
- Furukawa Y, Terui Y, Sakoe K, Ohta M, Saito M (1994) The role of cellular transcription factor E2F in the regulation of cdc2 mRNA expression and cell cycle control of human hematopoietic cells, *J. Biol Chem* 269: 26249-26258.
- Gargett BE, Chan RW (2006) Endometrial stem/progenitor cells and proliferative disorders of the endometrium. *Minerva Ginecol* 58:511-526.
- Geng Y, Eaton EN, Picón M, Roberts JM, Lundberg AS, Gifford A, Sardet C, Weinberg RA (1996) Regulation of cyclin E transcription by E2Fs and retinoblastoma protein. *Oncogene* 12: 1173-1180.
- Gentilini D, Busacca M, Di Francesco S, Vignali M, Viganò P, Di Blasio AM (2007) PI3K/Akt and ERK1/2 signalling pathways are involved in endometrial cell migration induced by 17beta-estradiol and growth factors. *Mol Hum Reprod* 13:317-22.
- Geum D, Sun W, Paik SK, Lee CC, Kim K (1997) Estrogen-induced cyclin D1 and D3 gene expressions during mouse uterine cell proliferation in vivo: differential induction mechanism of cyclin D1 and D3. *Mol Reprod Dev* 46:450-458.
- Giangrande PH, Pollio G, McDonnell DP (1997) Mapping and characterization of the functional domains responsible for the differential activity of the A and B isoforms of the human progesterone receptor. *J Biol Chem* 272: 32889-32900.
- Gibson MK, Nemmers LA, Beckman WC Jr, Davis VL, Curtis SW, Korach KS (1991) The mechanism of ICI 164,384 antiestrogenicity involves rapid loss of estrogen receptor in uterine tissue. *Endocrinology* 129:2000-2010.
- Gladden AB, Diehl JA (2005) Location, Location, Location: The Role of Cyclin D1 Nuclear Localization in Cancer. *J Cell Biochem* 86:906-913.
- Gore-Langton RE, Armstrong DT (1988) Follicular steroidogenesis and its control. In: *Physiology of Reproduction*. Knobil E, Neill J (Eds) Raven Press Ed. NY 1: 331-335.
- Graham JD, Clarke CL (1997) Physiological action of progesterone in target tissues. *Endocr Rev* 18: 502-519.
- Gray CA, Bartol FF, Tarleton BJ, Wiley AA, Johnson GA, Bazer FW, Spencer TE (2001) Developmental Biology of Uterine Glands. *Biol Reprod* 65:1311-1323

- Grimes CA, Jope RS (2001) The multifaceted roles of glycogen synthase kinase 3 β in cellular signaling. *Prog Neurobiol* 65:391–426.
- Guerra-Araiza C, Camacho-Arroyo I (2000) Progesterone receptor isoforms: function and regulation. *Rev Invest CLIN* 52: 686-691.
- Gunin AG (1997) Effect of heparin on oestradiol-induced cell growth and proliferation in the uterus of ovariectomized rats. *J Endocrinol* 154: 441-448.
- Guzeloglu Kayisli O, Kayisli UA, Luleci G, Arici A (2004) In Vivo and In Vitro Regulation of Akt Activation in Human Endometrial Cells Is Estrogen Dependent. *Biol Reprod* 71:714–721.
- Hall J, Couse JF, Korach KS (2001) The Multifaceted Mechanisms of Estradiol and Estrogen Receptor Signaling. *J Biol Chem* 276:36869-36872.
- Hafez ESE (1970) Female reproductive organs. *En Reproduction and breeding techniques for laboratory animals* (Hafez ESE, ed.) pp. 74, Lea y Febiger, USA.
- Hawkins PT, Anderson KE, Davidson K, Stephens LR (2006) Signalling through Class I PI3Ks in mammalian cells. *Biochem Soc Trans* 34:647-662.
- Heldring N, Pike A, Andersson S, Matthews J, Cheng G, Hartman J, Tujague M, Ström A, Treuter E, Warner M, Gustafsson JA (2007) Estrogen Receptors: How Do They Signal and What Are Their Targets. *Physiol Rev* 87: 905-931.
- Herber B, Truss M, Beato M, Muller R (1994) Inducible regulatory elements in the human cyclin D1 promoter. *Oncogene* 9:1295-1304.
- 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* 83:4794-4798.
- Howell A, Osborne CK, Morris C, Wakeling AE (2000) ICI 182,780 (Faslodex) Development of a Novel, “Pure” Antiestrogen. *Cancer* 89:817-825.
- Hsueh JS, Adashi EY, Jones PB, Welsh TH Jr (1984) Hormonal regulation of the differentiation of cultured ovarian granulosa cells. *Endocr Rev* 5: 76-127.
- Huet X, Rech J, Plet A, Vié A, Blanchard JM (1996) Cyclin A expression is under negative transcriptional control during the cell cycle. *Mol Cell Biol* 16:3789–3798.
- Hughes K, Nikolakaki E, Plyte SE, Totty NF, Woodgett JR (1993) Modulation of the glycogen synthase kinase-3 family by tyrosine phosphorylation. *EMBO J* 12:803–808.
- Hunter T, Pines J (1994) Cyclins and cancer II: cyclin D and CDK inhibitors come of age. *Cell* 79: 573–582.
- Huynh HT, Pollak M (1993) Insulin-like growth factor 1 gene expression in uterus is stimulated by tamoxifen and inhibited by the pure antiestrogen ICI 182,780. *Cancer Res* 53: 5585-5588.
- Hutcheson IR, Knowlden JM, Madden T-A, Barrow D, Gee JM, Wakeling AE, Nicholson RI (2003) Oestrogen receptor-mediated modulation of the EGFR/MAPK pathway in tamoxifen-resistant MCF-7 cells. *Breast Cancer Res Treat* 81:81-93.
- Hutchison JS, Nelson PB, Zeleznik AJ (1986) Effects of different gonadotropin pulse frequencies of corporous luteum function during the menstrual cycle of rhesus monkeys. *Endocrinology* 119:1964-1971.
- Hyder SM, Chiappetta C, Murthy L, Stancel GM (1997) Selective Inhibition of Estrogen-regulated gene expression in vivo by the pure antiestrogen ICI 182,780. *Cancer Res* 57:2547-2549.
- Jope RS, Yuskaitis CJ, Beurel E (2007) Glycogen Synthase Kinase-3 (GSK3): Inflammation, Diseases and Therapeutics. *Neurochem Res* 32:577-595.
- Kandel ES, Hay N (1999) The Regulation and Activities of the Multifunctional Serine/Threonine Kinase Akt/PKB. *Exp Cell Res* 253:210-229.
- Katzenellenbogen BS, Montano MM, Le Goff P, Scodin DJ, Kraus WL, Bhardwaj B, Fujimoto N (1995) Antiestrogens: Mechanisms and Actions in Target Cells. *J Steroid Biochem Molec Biol* 53:387-393.
- Kaye AM, Sheratzky D, Lindner HR (1972) Kinetics of DNA synthesis in immature rat uterus: age dependence and estradiol stimulation. *Biochim Biophys Acta* 261, 475-486.

- Kazi AA, Molitoris KH, Koos RD (2009) Estrogen Rapidly Activates the PI3K/AKT Pathway and Hypoxia-Inducible Factor 1 and Induces Vascular Endothelial Growth Factor A Expression in Luminal Epithelial Cells of the Rat Uterus. *Biol Reprod* 81:378–387.
- Kim SJ, 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* 10:1492-1497.
- 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.
- Kirkland JL, Murthy L, Stancel GM (1992) Progesterone inhibits the estrogen-induced expression of c-fos messenger ribonucleic acid in the uterus. *Endocrinology* 130:3223-3230.
- Kitazawa S, Kitazawa R, Maeda S (1999) Transcriptional regulation of rat cyclin D1 gene by CpG methylation status in promoter region. *J Biol Chem* 274:28787–28793.
- Klein EA, Assoian RK (2008) Transcriptional regulation of the cyclin D1 gene at a glance. *J Cell Sci* 121:3853-3857.
- Klinge CM (2001) Estrogen receptor interaction with estrogen response elements. *Nucleic Acids Res.* 29:2905-2919.
- Klotz DM, Hewitt SC, Ciana P, Raviscioni M, Lindzey JK, Foley J, Maggi A, DiAugustine RP, Korach KS (2002) Requirement of estrogen receptor- α in insulin-like growth factor-1 (IGF-1)-induced uterine responses and in vivo evidence for IGF-1/estrogen receptor cross-talk. *J Biol Chem* 277:8531–8537.
- 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. *Endocrinology* 132:2371-2379.
- Kraus WL, Montano MM, Katzenellenbogen BS (1993) Cloning of the rat progesterone receptor gene 5'-region and identification of two functionally distinct promoters. *Mol Endocrinol* 7:1603-1616.
- Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA (1996) Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 5925–5930.
- Kuiper GG, Gustafsson JA (1997) The novel estrogen receptor-beta subtype: potential role in the cell- and promoter-specific actions of estrogens and anti-estrogens. *FEBS Lett* 410: 87–90.
- LaBaer J, Garrett MD, Stevenson LF, Slingerland JM, Sandhu C, Chou HS, Fattaey A, Harlow E (1997) New functional activities for the p21 family of CDK inhibitors. *Genes Dev* 11: 847–862.
- Lengyel F, Vértés Z, Kovács KA, Környei JL, Sumegi B, Vértés M (2004) Expression and activation of Akt/protein kinase B in sexually immature and mature rat uterus. *J Steroid Biochem Mol Biol* 91:285-288.
- Leroy F, Galand P, Chrétien J (1969) The mitogenic action of ovarian hormones on the uterine and the vaginal epithelium during the oestrous cycle in the rat: A radioautographic study. *J Endocrinol* 45:441–447.
- Levin ER (2008) Rapid Signaling by steroid receptors. *Am J Physiol Integr Comp Physiol* 295: R1425-R1430.
- Li L, Xie T (2005) Stem cell niche: structure and function. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21:605–631.
- Long X, Nephew KP (2006) Fulvestrant (ICI 182, 780)-dependent Interacting Proteins Mediate Immobilization and Degradation of Estrogen Receptor- α . *J Biol Chem* 281:9607-9615.
- Li Y, Birnbaumer L, Teng CT (2010) Regulation of ER α gene expression by estrogen receptor agonists and antagonists in SKBR3 breast cancer cells: differential molecular mechanisms mediated by G protein-coupled receptor GPR30/GPER-1. *Mol Endocrinol* 24:969-980.
- Loose-Mitchell DS, Chiappetta C, Stancel GM (1988) Estrogen regulation of c-fos messenger ribonucleic acid. *Mol Endocrinol* 2:946–951.
- Lopez-Illasaca M, Crespo P, Pellici PG, Gutkind JS, Wetzker R (1997) Linkage of G protein-coupled receptors to the MAPK signaling pathway through PI3-kinase gamma. *Science* 275:394-397.
- Macgregor JJ, Jordan VC (1998) Basic Guide to the Mechanisms of Antiestrogen Action. *Pharmacol Rev* 50:151-190.

- Marcondes FK, Bianchi FJ, Tanno AP (2002) Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Braz J Biol* 62(4A):609-614.
- Marcus GJ (1974) Mitosis in the rat uterus during the estrous cycle, early pregnancy, and early pseudopregnancy. *Biol Reprod* 10:447-452.
- Marte BM, Downward J (1997) PKB/akt: connecting phosphoinositide 3-kinase to cell survival and beyond. *TIBS* 22:355-358.
- Martel C, Labrie C, Belanger A, Gauthier S, Meránd Y, Li X, Provencher L, Candas B, Labrie F (1998a) Comparison of the effects of the new orally active antiestrogen EM-800 with ICI 182,780 and Toremifene on Estrogen-Sensitive Parameters in the ovariectomized mouse. *Endocrinology* 139:2486-2492.
- Martel C, Provencher L, Li X, St Pierre A, Leblanc G, Gauthier S, Meránd Y, Labrie F (1998b) Binding Characteristics of Novel Nonsteroidal Antiestrogens to the Rat Uterine Estrogen Receptors. *J Steroid Biochem Mol Biol* 64:199-205.
- Martin L, Finn CA, Trinder G (1973) Hypertrophy and hyperplasia in the mouse uterus after oestrogen treatment: an autoradiographic study. *J Endocrinol* 56:133-144.
- Martin L, Pollard JW, Fagg B (1976) Oestriol, oestradiol-17 β and the proliferation and death of uterine cells. *J Endocrinol* 69:103-115.
- Matthews J, Gustafsson JA (2003) Estrogen signaling: A Subtle Balance between ER α and ER β . *Molecular Interventions* 3:281-292.
- McClelland RA, Gee JM, Francis AB, Robertson JF, Blamey RW, Wakeling AE, Nicholson RI (1996) Short term effects of pure anti-oestrogen ICI 182780 treatment on oestrogen receptor, epidermal growth factor receptor and transforming growth factor-alpha protein expression in human breast cancer. *Eur J Cancer* 32A:413-416.
- McKenna NJ, Lanz RB, O'Malley BW (1999) Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocr Rev* 20:321-344.
- McKenna NJ, O'Malley BW (2000) From Ligand to response: generating diversity in nuclear receptor coregulator function. *J Steroid Biochem Mol Biol* 74: 351-356.
- Mendoza-Rodríguez CA, Arrieta-Cruz I, Rodríguez-Dorantes M, Camacho-Arroyo I, Cerbón M (2001) 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, Martínez MA, Vargas O, Nava K, Morimoto S, Espinosa M, Cerbón M (2009) Mating modifies apoptosis pattern in epithelial cells of the rat uterus. *Mol Reprod Dev* 76:564-572.
- 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. *Mol Reprod Dev* 61:445-452.
- Mendoza-Rodríguez CA, Merchant-Larios H, Segura-Valdez ML, Moreno-Mendoza N, Cruz ME, Arteaga-López P, Camacho-Arroyo I, Domínguez R, Cerbón M (2003) c-fos and estrogen receptor gene expression pattern in the rat uterine epithelium during the estrous cycle. *Mol Reprod Dev* 64: 379-388.
- Meng Q, Xia C, Fang J, Rojanasakul Y, Jiang BH (2006) Role of PI3K and Akt specific isoforms in ovarian cancer cell migration, invasion and proliferation through the p70S6K1 pathway. *Cell Signal* 18:2262-2271.
- Miller AD, Curran T, Verma IM (1984) c-fos protein can induce cellular transformation: a novel mechanism of activation of a cellular oncogene. *Cell* 36:51-60.
- Molnar P, Murphy LJ (1994) Effects of oestrogen on rat uterine expression of insulin-like growth factor-binding proteins. *J Mol Endocrinol* 13:59-67.
- Morgan DO (1995) Principles of CDK regulation. *Nature* 374:131-134.

- 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* 246:249-251.
- Mullany LK, White P, Hanse EA, Nelsen CJ, Goggin MM, Mullany JE, Anttila CK, Greenbaum LE, Kaestner KH, Albrecht JH (2008) Distinct proliferative and transcriptional effects of the D-type cyclins in vivo. *Cell Cycle* 7:2215–2224.
- Murphy LJ, Murphy LC, Friesen HG (1987) Estrogen induction of N-myc and c-myc proto-oncogene expression in the rat uterus. *Endocrinology* 120:1882–1888.
- Musgrove EA, Hamilton JA, Lee CS, Sweeney KJ, Watts CK, Sutherland RL (1993) Growth factor, steroid, and steroid antagonist regulation of cyclin gene expression associated with changes in T-47D human breast cancer cell cycle progression. *Mol Cell Biol* 13:3577–3587.
- 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* 20:1203–1209.
- 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* 62:168–177.
- 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. *Endocrinology* 136:3007–3015.
- 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 c-fos and estrogen receptor gene expression in specific cell types of the rat uterus. *J Steroid Biochem Mol Biol* 46:281–287.
- Nicholson KM, Anderson NG (2002) The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. *Cell Signal* 14:381–395.
- Nicholson RI, Gee JM, Francis AB, Manning DL, Wakeling AE, Katzenellenbogen BS (1995a) Observations arising from the use of pure antioestrogens on oestrogen-responsive (MCF-7) and oestrogen growth-independent (K3) human breast cancer cells. *Endocr Relat Cancer* 2:115-121.
- Nicholson RI, Gee JM, Manning DL, Wakeling AE, Montano MM, Katzenellenbogen BS (1995b) Responses to pure antiestrogens (ICI 164,384, ICI 182,780) in estrogen-sensitive and resistant experimental and clinical breast cancer. *Ann NY Acad Sci* 761:148-163.
- Nilsson S, Mäkelä S, Treuter E, Tujague M, Thomsen J, Andersson G, Enmark E, Pettersson K, Warner M, Gustafsson JA (2001) Mechanism of Estrogen Action. *Physiol Rev* 81: 1535-1566.
- Ohta Y, Sato T, Iguchi T (1993) Immunocytochemical Localization of Progesterone Receptor in the Reproductive Tract of Adult Female Rats. *Biol Reprod* 48:205-213.
- Ohtani K, DeGregori J, Nevins JR (1995) Regulation of the cyclin E gene by transcription factor E2F1. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 12146–12150.
- O'Regan RM., Cisneros A, England GM, MacGregor JI, Muenzner HD, Assikis VJ, Bilimoria MM, Piette M, Dragan YP, Pitot HC, Chatterton R, Jordan VC (1998) Effects of the antiestrogens tamoxifen, toremifene, and ICI 182,780 on endometrial cancer growth. *J. Natl. Cancer. Inst.* 90: 1552–1558.
- Osborne CK, Coronado-Heinsohn EB, Hilsenbeck SG, McCue BL, Wakeling AE, McClelland RA, Manning DL, Nicholson RI (1995) Comparison of the effects of a pure steroidal antiestrogen with those of tamoxifen in a model of human breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 87:746-750.
- Osborne CK, Wakeling A, Nicholson RI (2004) Fulvestrant: an oestrogen receptor antagonist with a novel mechanism of action. *Br J Cancer* 90:S2 – S6
- 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* 175:480–485.
- Perrot-Aplanat M, David Ferreira JF (1982) Immunocytochemical localization of progesterone-binding protein (PBP) in guinea pig placental tissue. *Cell Tissue Res* 223:1511-1519.

- Pestell RG, Albanese C, Reutens AT, Segall JE, Lee RJ, Arnold A (1999) The Cyclins and Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors in Hormonal Regulation of Proliferation and Differentiation. *Endocrine Reviews* 20:501–534.
- Pinto PI, Singh PB, Condeça JB, Teodósio HR, Power DM, Canário AV (2006) ICI 182,780 has agonistic effects and synergizes with estradiol-17 beta in fish liver, but not in testis. *Reprod Biol Endocrinol* 4: 67-77.
- Polyak K, Kato JY, Solomon MJ, Sherr CJ, Massague J, Roberts JM, Koff A (1994) 27Kip1, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest. *Genes Dev* 8: 9–22.
- Pomata PE, Colman-Lerner AA, Baranao JL, Fiszman ML (2000) In vivo evidences of early neurosteroid synthesis in the developing rat central nervous system and placenta. *Dev Brain Res* 120: 83-86.
- Quantin B, Breathnach R (1988) Epidermal growth factor stimulates transcription of the c-jun proto-oncogene in rat fibroblasts. *Nature* 334:538-539.
- Quarmany VE, Korach KS (1984) The influence of 17 β -estradiol on patterns of cell division in the uterus. *Endocrinology* 114:694–702.
- Ramos JG, Varayoud J, Bosquiaz VL, Luque EH, Muñoz-de-Toro M (2002) Cellular Turnover in the Rat Uterine Cervix and Its Relationship to Estrogen and Progesterone Receptor Dynamics. *Biol Reprod* 67:735-742.
- Ransone LJ, Verma IM (1990) Nuclear proto-oncogenes fos and jun. *Annu Rev Cell Biol* 6: 539-557.
- Rhodes D (1997) The nucleosome core all wrapped up. *Nature* 389:231-233.
- 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* 8:1670-1676.
- Rider V, Thomson E, Seifert C (2003) Transit of rat uterine stromal cells through G1 phase of the cell cycle requires temporal and cell-specific hormone-dependent changes on cell cycle regulators. *Endocrinology* 144: 5450-5458.
- Robertson JA, Zhang Y, Ing NH (2001) ICI 182,780 acts as a partial agonist and antagonist of estradiol effects in specific cells of the sheep uterus. *J Steroid Biochem Mol Biol* 77:281-287.
- Sahlin L, Eriksson H (1996) Influence of Blockers for the Estrogen Receptor (ER) and Type 1 IGF-receptor on the Levels of ER, ER mRNA and IGF-I mRNA in the Rat Uterus. *J Steroid Biochem Mol Biol* 58:359-365.
- Sakamaki T, Casimiro MC, Ju X, Quong AA, Katiyar S, Liu M, Jiao X, Li A, Zhang X, Lu Y, Wang C, Byers S, Nicholson R, Link T, Shemluck M, Yang J, Fricke ST, Novikoff PM, Papanikolaou A, Arnold A, Albanese C, Pestell R (2006) Cyclin D1 determines mitochondrial function in vivo. *Mol Cell Biol* 26:5449–5469.
- 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* 269:28955-28962.
- Shaulian E, Karin M (2001) AP-1 in cell proliferation and survival. *Oncogene* 20:2390-2400.
- Schulze A, Zerfass K, Spitkovsky D, Middendorp S, Bergès J, Helin K, Jansen-Dürr P, Henglein B (1995) Cell cycle regulation of the cyclinA gene promoter is mediated by a variant E2F site. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 11264–11268.
- Schütte J, Minna JD, Birrer MJ (1989) Desregulated 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* 86:2257-2261.
- Shen Q, Uray IP, Li Y, Krisko TI, Strecker TE, Kim HT, Brown PH (2007) The AP-1 transcription factor regulates breast cancer cell growth via cyclins and E2F factors. *Oncogene* 27:366-377.
- Sherr CJ (1994) G1 phase progression: cycling on cue. *Cell* 79: 551–555.
- Shtilbans V, Wu M, Burstein DE (2008) Current overview of the role of Akt in cancer studies via applied immunohistochemistry. *Annals of Diagnostic Pathology* 12:153-160.
- Sibonga JD, Dobnig H, Harden RM, Turner RT (1998) Effect of the High-Affinity Estrogen Receptor Ligand ICI 182,780 on the Rat Tibia. *Endocrinology* 139:3736-3742.

- Simoncini T, Hafezi-Moghadam A, Brazil DP, Ley K, Chin WW, Liao JK (2000) Interaction of oestrogen receptor with the regulatory subunit of phosphatidylinositol-3-OH kinase. *Nature* 407:538–541.
- Song G, Ouyang G, Bao S (2005) The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *J Cell Mol Med* 9:59-71.
- 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.
- Stygar D, Muravitskaya N, Eriksson B, Eriksson H, Sahlin L (2003) Effects of SERM (selective estrogen receptor modulator) treatment on growth and proliferation in the rat uterus. *Reprod Biol Endocrinol* 1:40.
- 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 Fertil* 31: 59–76.
- Tan H, Zhong Y, Pan Z (2009) Autocrine regulation of cell proliferation by estrogen receptor-alpha in estrogen receptor-alpha-positive breast cancer cell lines. *BMC* 9: 31-42.
- Thomas EJ, Walton PL, Thomas NM, Dowsett M (1994) The effects of ICI 182,780, a pure anti-oestrogen, on the hypothalamic-pituitary-gonadal axis and on endometrial proliferation in premenopausal women. *Hum Reprod* 9:1991–1996.
- Tommasi S, Pfeifer GP (1995) In vivo structure of the human cdc2 promoter: release of a p130-E2F-4 complex from sequences immediately upstream of the transcription initiation site coincides with induction of cdc2 expression. *Mol Cell Biol* 15: 6901–6913.
- Tong W, Pollard JW (1999) Progesterone inhibits estrogen-induced cyclin D1 and cdk4 nuclear translocation, cyclin E- and cyclin A-cdk2 kinase activation, and cell proliferation in uterine epithelial cells in mice. *Mol Cell Biol* 19:2251–2264.
- Toyofuku A, Hara T, Taguchi T, Katsura Y, Ohama K, Kudo Y (2006) Cyclic and characteristic expression of phosphorylated Akt in human endometrium and decidual cells in vivo and in vitro. *Hum Rep* 21:1122-1128.
- Toyoshima H, Hunter T (1994) p27, a novel inhibitor of G1 cyclin-Cdk protein kinase activity, is related to p21. *Cell* 78: 67–74.
- Travers MT, Knowler JT (1987) Oestrogen-induced expression of oncogenes in the immature rat uterus. *FEBS Lett* 211:27–30.
- Tsai MJ, O'Malley B (1994) Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annu Rev Biochem* 63: 451-486.
- Ukena K, Kohchi C, Tsutsui K (1999) Expression and activity of 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta5-delta4isomerase in the rat Purkinje neuron during neonatal life. *Endocrinology* 140:805-813.
- Vivacqua A, Bonofiglio D, Albanito L, Madeo A, Rago V, Carpino A, Musti AM, Picard D, Andò S, Maggiolini M (2006) 17β-estradiol, genistein, and 4-hydroxytamoxifen induce the proliferation of thyroid cancer cells through the G protein-coupled receptor GPR30. *Mol Pharmacol* 70:1414-1423.
- Wade GN, Blaustein JD, Gray JM, Meredith JM (1993) ICI 182,780: a pure antiestrogen that effects behaviors and energy balance in rats without acting in the brain. *Am J Physiol* 256:1392-1398.
- Wakeling AE (1995) Use of pure antioestrogens to elucidate the mode of action of oestrogens. *Biochem Pharmacol* 49:1545-1549.
- Wakeling AE (2000) Similarities and distinctions in the mode of action of different classes of antioestrogens. *Endocr Relat Cancer* 7:17-28.
- Wakeling AE, Bowler J (1987) Steroidal pure antiestrogens. *J Endocrinol* 112:R7-R10.
- Wakeling AE, Bowler J (1992) ICI 182,780, a new antioestrogen with clinical potential. *J Steroid Biochem Mol Biol* 43:173-177
- Wakeling AE, Dukes M, Bowler J (1991) A potent specific pure antiestrogen with clinical potential. *Cancer Res* 51:3867-3873.
- Wang H, Masironi B, Eriksson H, Sahlin L (1999) A comparative study of estrogen receptors α and β in the rat uterus. *Biol Reprod* 61:955–964.

- Wang QM, Fiol CJ, DePaoli-Roach AA, Roach PJ (1994) Glycogen synthase kinase-3 β is a dual specificity kinase differentially regulated by tyrosine and serine/threonine phosphorylation. *J Biol Chem* 269:14566–14574.
- Wardley AM (2002) Fulvestrant: a review of its development, pre-clinical and clinical data. *Int J Clin Pract* 56:305-309.
- Watts CK, Brady A, Sarcevic B, deFazio A, Musgrove EA, Sutherland RL (1995) Antiestrogen inhibition of cell cycle progression in breast cancer cells is associated with inhibition of cyclin-dependent kinase activity and decreased retinoblastoma protein phosphorylation. *Mol Endocrinol* 9:1804–1813.
- Webb DK, Moulton BC, Khan SA (1993) Estrogen induces expression of c-jun and jun-B protooncogenes in specific rat uterine cells. *Endocrinology* 133:20–28.
- Weisz A, Bresciani F (1988) Estrogen induces expression of c-fos and c-myc protooncogenes in rat uterus. *Mol Endocrinol* 2:816–824.
- Weisz A, Cicatiello L, Persico E, Scalona M, Bresciani F (1990) Estrogen stimulates transcription of c-jun protooncogene. *Mol Endocrinol* 4:1041–1050.
- Weisz J, Ward IL (1980) Plasma testosterone and progesterone titers of pregnant rats, their male and female fetuses, and neonatal offspring. *Endocrinology* 106: 306-316.
- Westwood RF (2008) *The Female Rat Reproductive Cycle: A Practical Histological Guide to Staging*. *Toxicologic Pathology* 37:375-384.
- Wijayaratne AL, Nagel SC, Paige LA, Christensen DJ, Norris JD, Fowlkes DM, McDonnell DP (1999) Comparative Analyses of Mechanistic Differences Among Antiestrogens. *Endocrinology* 140: 5828-5840.
- Wilken NR, Sarcevic B, Musgrove EA, Sutherland RL (1996) Differential effects of retinoids and antiestrogens on cell cycle progression and cell cycle regulatory genes in human breast cancer cells. *Cell Growth Differ* 7:65–74.
- Wisdom R, Johnson RS, Moore C (1999) c-Jun regulates cell cycle progression and apoptosis by distinct mechanisms. *EMBO J* 18:188-197.
- Wolffe AP, Pruss D (1996) Targeting chromatin disruption: Transcription regulators that acetylate histones. *Cell* 84: 817-819.
- Wong JK, Le HH, Zsarnovszky A, Belcher SM (2003) Estrogens and ICI182,780 (Faslodex) modulate mitosis and cell death in immature cerebellar neurons via rapid activation of p44/p42 mitogen-activated protein kinase. *J Neurosci* 23:4984–4995.
- Wu Y, Guo SW (2006) Inhibition of Proliferation of Endometrial Stromal Cells by Trichostatin, RU486, CDB-2914, N-Acetylcysteine, and ICI 182780. *Gynecol Obstet Invest* 62:193-205.
- Yu X, Filardo EJ, Shaikh ZA (2010) The membrane estrogen receptor GPR30 mediates cadmium-induced proliferation of breast cancer cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 245:83-90.
- Zhang Z, Laping J, Glasser S, Day P, Mulholland J (1998) Mediators of estradiol-stimulated mitosis in the rat uterine luminal epithelium. *Endocrinology* 139: 961-966.
- Zhao L, Vogt PK (2008) Class I PI3K in oncogenic cellular transformation. *Oncogene* 27: 5486-5496.
- Zhu L, Pollard JW (2007) Estradiol-17 β regulates mouse uterine epithelial cell proliferation through insulin-like growth factor 1 signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:15847-15851.
- 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(kip1) expression by estrogen in rat endometrium. *J Steroid Biochem Mol Biol* 78:193–199.
- Zwain IH, Yen SS (1999) Neurosteroidogenesis in astrocytes, oligodendrocytes and neurons of cerebral cortex of rat brain. *Endocrinology* 140: 3843-3852.