



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

EFFECTO DEL ESTRADIOL SOBRE LAS
ISOFORMAS DEL RECEPTOR A ESTRÓGENOS
EN LÍNEAS CELULARES DE ASTROCITOMAS
HUMANOS

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
B I Ó L O G A
P R E S E N T A:
MARIANA RIVAS SUÁREZ

Director de Tesis: DR. IGNACIO CAMACHO ARROYO



MÉXICO, D. F.

2007



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Esta tesis fue realizada en el Departamento de Biología de la Facultad de Química de la U. N. A. M. bajo la dirección del Dr. Ignacio Camacho Arroyo con el apoyo del proyecto CONACYT 43224, del cual se obtuvo una beca de tesis de licenciatura.

<p>1. Datos del alumno Autor Apellido paterno Apellido materno Nombre (s) Teléfono Universidad Facultad o escuela Carrera No. de cuenta</p>	<p>1. Datos del alumno Rivas Suárez Mariana 56 10 56 52 Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Ciencias Biología 09927457-7</p>
<p>2. Datos del asesor Grado Nombre (s) Apellido paterno Apellido materno</p>	<p>2. Datos del asesor Dr Ignacio Camacho Arroyo</p>
<p>3. Datos del sinodal Grado Nombre (s) Apellido paterno Apellido materno</p>	<p>3. Datos del sinodal Dr Néstor Fabián Díaz Martínez</p>
<p>4. Datos del sinodal Grado Nombre (s) Apellido paterno Apellido materno</p>	<p>4. Datos del sinodal Dra Aliesha Araceli González Arenas</p>
<p>5. Datos del sinodal Grado Nombre (s) Apellido paterno Apellido materno</p>	<p>5. Datos del sinodal M en C Edith Araceli Cabrera Múñoz</p>
<p>6. Datos del sinodal Grado Nombre (s) Apellido paterno Apellido materno</p>	<p>6. Datos del sinodal M en C Gabriela González Agüero</p>
<p>7. Datos de la tesis Titulo No. de páginas Año</p>	<p>7. Datos de la tesis Efecto del estradiol sobre las isoformas del receptor a estrógenos en líneas celulares de astrocitomas humanos. 37 p 2007.</p>

Nuestra recompensa se encuentra en
el esfuerzo y no en el resultado, un
esfuerzo total es una victoria
completa

Mahatma Gandhi

*A **Tathis** por ser la principal fuente de inspiración, porque me has enseñado tanto siendo tan pequeñita, gracias!! por que llegaste en el momento adecuado y llenaste mi vida de alegría y felicidad. TE ADORO mons.*

A **David**, porque hasta ahora has sido el más grande amor de mi vida, por darme todo tu amor, tu comprensión y tu paciencia. Gracias por hacerme ver la realidad, porque a pesar de todo nunca me has dejado sola. TE AMO.

A mi familia,

Mi mamá *Martha Suárez*, por darme la vida y estar conmigo.

A mis hermanos *Filomeno* y *Alejandro*. Gracias por esta a mi lado en cada paso que doy, por apoyarme cuando mas los necesite.

A mi "hermanito" *Oscar Daniel*.

Los quiero muchísimo!

A mis sobrinos

Héctor Francisco, te quiero mucho chiki-rrikis y *Daniela Mariana*,

A mi abuela

Guadalupe García por siempre estar al pendiente.

A mis tíos

Gabriela gracias porque siempre has creído en mí; *Alejandra*, *Pedro* y *Fabiola* por sus consejos.

A mis primos

Daniela Guadalupe por ser una gran enseñanza de vida (mi niña te quiero muchísimo), *Karla*, *Lisete*, *Pedro* y *Laura*, a todos ustedes recuerden que el camino no es corto pero a paso firme se llega.

A mis **AMIGOS**, que incondicionalmente han estado siempre conmigo, por las fiestas ("por esas fiestas"), los días en el tiradero, las practicas, las platicas, GRACIAS: Anuar (fuiste mi primer amigo), Alma, Esme, Ivonne, Gaby, Zizi, Rod, Jonathan, Rafael, Pamela, Dafne. Gracias por formar parte de mi vida y por todo lo que me quedo de cada uno.

A todos aquellos que han llegado a mi vida y la han llenado de diversión y locuras (Haen, Marco, Isra, Karla "Vieja", Chino, Ernesto, Lara, Luis Enrique, Lety, Luis Angel, y la lista sigue), además de que en muchos de ustedes he encontrado una amistad sincera y divertida, gracias chavos!!!

Al **Dr. Ignacio Camacho** por permitirme trabajar en su laboratorio y apoyarme.
¡Gracias Nacho! Por ejercer presión.

Al **Dr. Christian Guerra** (Chriss-cross) por todos sus conocimientos y el gran apoyo
que me has brindado hasta ahora.

A todos los del labo:

Aliesha, Edith, Milena, Tere, Fabian, Gerardo, Ivan, Tania, por todas esas horas de
trabajo divertidas, todas las horas de risas, las pláticas y consejos que me brindaron.
En especial a Gaby porque he encontrado en ti una amistad sincera, por tus pláticas,
por permitirme conocerte y darme cuenta que no eres tan refunfuñona (jeje),

GRACIAS

Por supuesto a la Sra. Genoveva parte fundamental del labo sin ella no tendríamos con
que trabajar, gracias por esas mañanas de pláticas!

INDICE

1. Resumen	7
2. Introducción	8
3. Antecedentes	9
3.1 Estructura y función de las hormonas sexuales	9
3.1.1 Estructura y función del estradiol	10
3.2 Receptor a estrógenos	13
3.2.1 Estructura y función del receptor a estrógenos	13
3.2.2 Isoformas del receptor a estrógenos	14
3.2.3 Antagonistas del receptor a estrógenos	17
3.3 Tumores del Sistema Nervioso Central	18
3.3.1 Astrocitomas	20
3.3.2 Expresión del receptor a estrógenos en astrocitomas	21
4. Planteamiento del problema	23
5. Hipótesis	23
6. Objetivo	23
7. Materiales y Métodos	24
7.1 Cultivo Celular	24
7.2 Extracción de Proteínas totales	24
7.3 Inmunoprecipitación	25
7.4 Western Blot	25
7.5 Análisis de Resultados	26
8. Resultados	27
9. Discusión	30
10. Conclusiones	32
11. Referencias	33

1. RESUMEN

El estradiol (E_2) es una hormona esteroide que se produce principalmente en el ovario y participa en el control de las funciones reproductivas, además regula el crecimiento, diferenciación y función de tejidos blanco como el útero, la glándula mamaria, el sistema nervioso, el hueso y el sistema inmunológico. Muchas de las funciones del E_2 están mediadas a través de su interacción con su receptor intracelular (RE). Se han identificado dos isoformas del RE: RE- α y RE- β que son producto de diferentes genes y tiene diferentes funciones y regulación. En líneas derivadas de astrocitomas humanos se desconoce la presencia del RE.

En este trabajo se estudiaron los efectos del E_2 sobre el contenido de las isoformas del RE: RE- α y RE- β en dos líneas celulares de astrocitomas humanos: D54 y U373 (grados III y IV de evolución respectivamente) las cuales fueron tratadas con Vehículo (ciclodextrina, 30 nM, en agua estéril); E_2 (10 nM) acoplado a ciclodextrina; ICI 182,780 (antagonista del RE) (2 μ M); E_2 + ICI 182,780 por 24 horas. Se extrajeron las proteínas y mediante la técnica de Western Blot se detectaron las isoformas del RE (RE- α y RE- β) y de α -tubulina que fue utilizada como control de carga.

Se encontró que el contenido de RE- α en la línea U373 presenta una disminución con los tratamiento de E_2 , ICI e ICI+ E_2 , mientras que en la línea D54 el tratamiento de E_2 no tiene un efecto significativo pero el ICI e ICI+ E_2 disminuyeron el contenido del RE- α . En el caso de RE- β hay un aumento en el contenido del receptor con los tratamientos de E_2 e ICI en ambas líneas celulares. En la línea D54 también hubo un aumento significativo con el tratamiento de ICI+ E_2 .

2. INTRODUCCIÓN

Muchos de los efectos de los estrógenos están mediados por sus receptores intracelulares específicos (RE) que funcionan como factores de transcripción dependientes de ligando (Camacho-Arroyo, 2003). La regulación inadecuada de los RE está relacionada con varios trastornos como el cáncer. Hasta el momento se sabe que muchos tumores del sistema nervioso central son negativos para el RE- α y solo pocos estudios han reportado la expresión del RE- β (Batistatou et al., 2005). Los astrocitomas son los tumores cerebrales más comunes y agresivos en el ser humano y se desconoce en ellos la regulación de las isoformas del RE.

En este trabajo se estudiaron los efectos del estradiol (E_2) sobre el contenido de las isoformas del RE en dos líneas celulares de astrocitomas humanos (U373 y D54) de grados III y IV de evolución respectivamente.

3. ANTECEDENTES

3.1 Estructura y función de las hormonas sexuales

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

Las hormonas sexuales son moléculas que están involucradas en la regulación de diversas funciones biológicas en los mamíferos, como la proliferación, la diferenciación, la homeostasis celular, el equilibrio hidroeléctrico, la función reproductiva, el dimorfismo sexual y la respuesta al estrés (Gram et al, 1997). Todas las hormonas sexuales, se derivan del colesterol, a partir del cual se forma la pregnenolona, que funciona como el principal intermediario para la síntesis de la mayoría de las hormonas sexuales. (Fig. 1).

Las hormonas sexuales tienen una velocidad de recambio elevada y no se almacenan sino una vez que son secretadas pasan al torrente sanguíneo donde pueden circular libres o unidas a proteínas plasmáticas, tales como albúmina (cuando el enlace es inespecífico y poco afín) o las globulinas (cuando el enlace es de gran especificidad y de gran afinidad) (Wilson et al, 1992).

El hígado es el órgano principal para el metabolismo de las hormonas sexuales (Greenspan et al., 1998). Los efectos de las hormonas sexuales ocurren a corto, mediano y largo plazo debido a que éstas tienen diversos mecanismos de acción (Camacho-Arroyo et al., 1995).

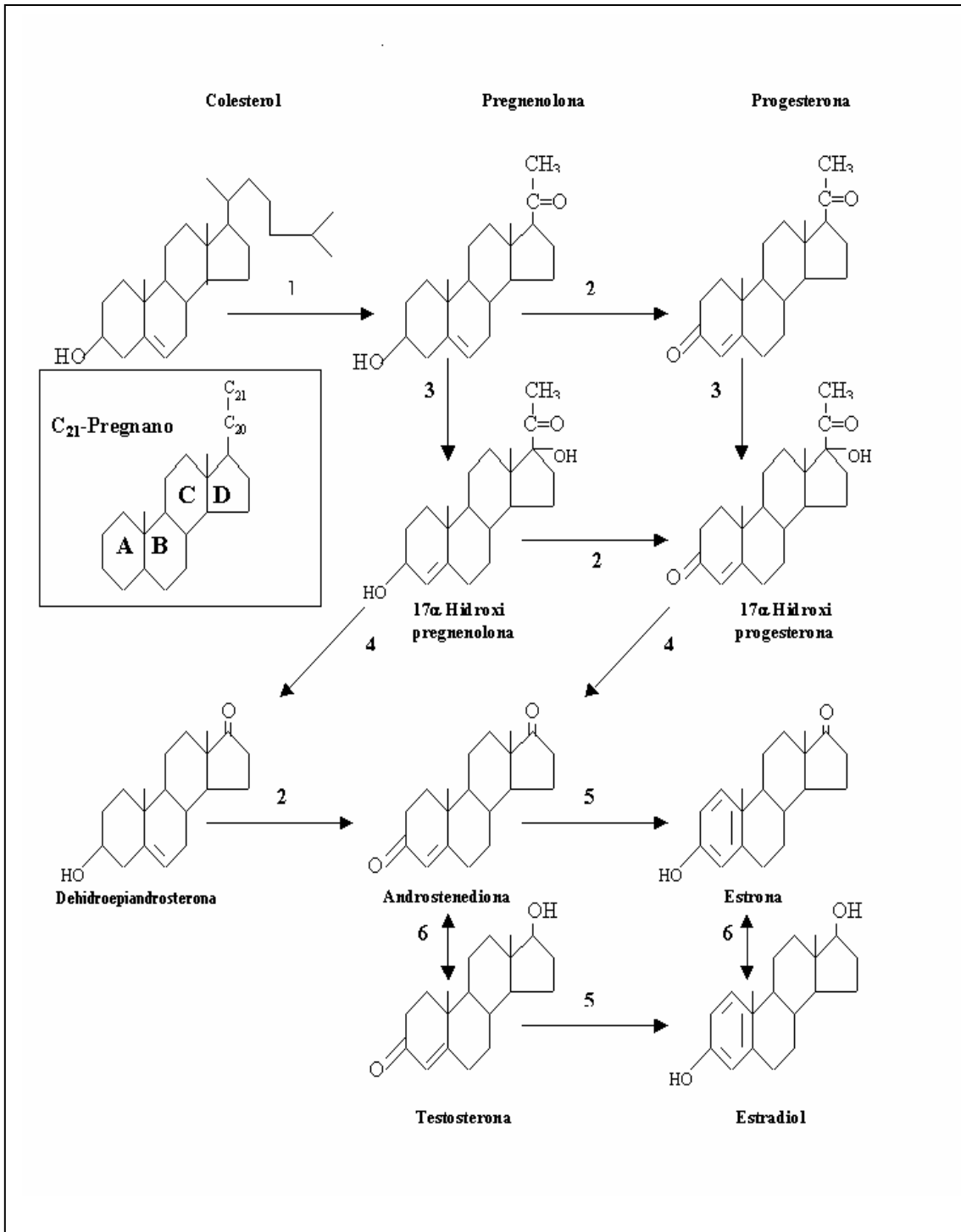


Fig. 1. Síntesis de los principales esteroides. 1)20,22 desmolasa; 2) 3β-OH-esteroide deshidrogenasa, 3)17α-hidroxilasa; 4)17, 20-esteroide liasa; 5) aromatasa; 6) 17β-OH-esteroide deshidrogenasa. En el recuadro se encuentra la estructura del pregnano al igual que las letras con las que se denominan a cada uno de los anillos de la estructura principal de las hormonas esteroides (Gore-Langton et al., 1988).

3.1.1 Estructura y función del estradiol (E₂)

El estrógeno natural en seres humanos es el 17 β-estradiol, seguido por la estrona y el estriol (Björntröm et al, 2005) (Fig. 2). Cada una de esas moléculas es un esteroide de 18 carbonos, que contiene un anillo fenólico A (un anillo aromático con un grupo hidroxilo en el carbono 3), y un grupo b-hidroxilo o cetona en la posición 17 del anillo D. El anillo fenólico A es la principal característica estructural, de la cual depende la unión selectiva y de alta afinidad a receptores a estrógenos.

El E₂ es producido principalmente en el ovario y participa en la regulación de las funciones reproductivas de los mamíferos, además regula el crecimiento, diferenciación y función de tejidos blanco como el útero, la glándula mamaria, el sistema nervioso, el esqueleto y el sistema inmunológico (González-Arenas et al., 2001, Björntröm et al, 2005, Batistatou et al., 2004.).

La estrona se metaboliza de forma irreversible en el hígado y, en menor proporción, en el riñón. La hidroxilación del anillo A origina los catecolandrógenos (2,3-dihidroxiestrona y 3,4-dihidroxiestrona) que son posteriormente metilados. La hidroxilación del anillo D origina el estriol y otros dos isómeros tri-hidroxilados, el 16-epiestriol y el 17-epiestriol.

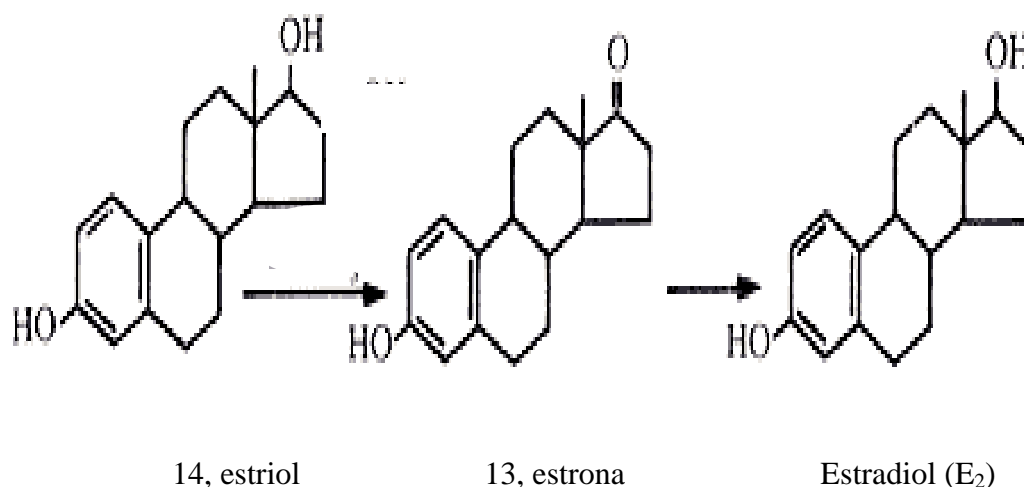


Fig 2. Estrógenos humanos más importantes

El E₂ es sintetizado por las células de la granulosa ovárica a partir de la androtenediona y la testosterona, que son precursores ováricos de esta hormona. La reacción es catalizada por un complejo de monooxigenasas (aromatasa) que emplea NADPH y O₂ como co-sustratos. También es esencial una flavoproteína y la NADPH citocromo P450 reductasa. La actividad de la aromatasa es inducida por las gonadotropinas que también inducen la síntesis de otras enzimas que intervienen en el proceso biosintético. En el hígado se realiza la interconversión estradiol-estrone-estriol y estos son secretados por la orina.

En el caso del Sistema Nervioso Central (SNC), la síntesis de esteroides por el cerebro ha llevado a utilizar el término neuroesteroide (es aquel esteroide que se sintetiza en el SN a partir de colesterol). En varios estudios han demostrado la presencia de enzimas estereidogénicas funcionales en el SN y éstas son capaces de sintetizar esteroides a partir de colesterol y metabolizar los esteroides periféricos que llegan al SN por circulación sanguínea, como es el caso de la testosterona en estradiol (Miñano, 2006). Entre las principales células estereidogénicas del SN se encuentran las células gliales (Zwain y Yen, 1999; Tsutsui et al., 2000)

3.2 Receptor a estrógenos

Los efectos biológicos de los estrógenos están mediados por dos receptores a estrógenos identificados, α y β (RE- α y RE- β), los cuales son miembros de la superfamilia de receptores nucleares de tipo I, también conocidos como clásicos o esteroides, entre los que se encuentran los receptores a: progestinas (RP), estrógenos (RE), andrógenos (RA), glucocorticoides (RG) y mineralocorticoides (RM), los cuales se encuentran unidos a proteínas de choque térmico en ausencia de ligando manteniéndose inactivos. Una vez activados por el ligando ejercen su acción mediante la interacción con elementos de respuesta a hormonas (HRE), que son secuencias palindrómicas ubicadas en la región promotora de los genes blanco específicos.

3.2.1 Estructura y función del receptor a estrógenos

El RE contiene como todos los receptores esteroides seis dominios característicos (Fig. 3): en el extremo N-terminal se encuentra el dominio A/B, la región de mayor variabilidad entre los diferentes receptores, tanto en secuencia como en longitud. El dominio A/B permite diferenciar entre isoformas del mismo receptor y tiene también la función de activación 1 (AF-1), que es una de las regiones con actividad transcripcional del receptor. En la región C se encuentra el dominio de unión al DNA (DBD), el cual es altamente conservado y está constituido por dos dedos de zinc. El dominio D presenta una secuencia variable conocida como bisagra y contiene una señal de localización nuclear. El dominio E está localizado hacia el extremo carboxilo terminal de la región D; es relativamente largo y funcionalmente diverso ya que participa en: la unión con el ligando, con proteínas de choque térmico, la dimerización y la interacción con los cofactores. Esta región contiene también una señal de localización nuclear y la función de activación 2 (AF-2) que juega un papel importante en la regulación de la transcripción (Tata, 2002; Prieto et al., 2003). En cuanto al dominio F, existen estudios que muestran que participa en la función transcripcional del receptor y en su unión con agonistas y antagonistas (Schwartz et al., 2002) (Fig. 3)

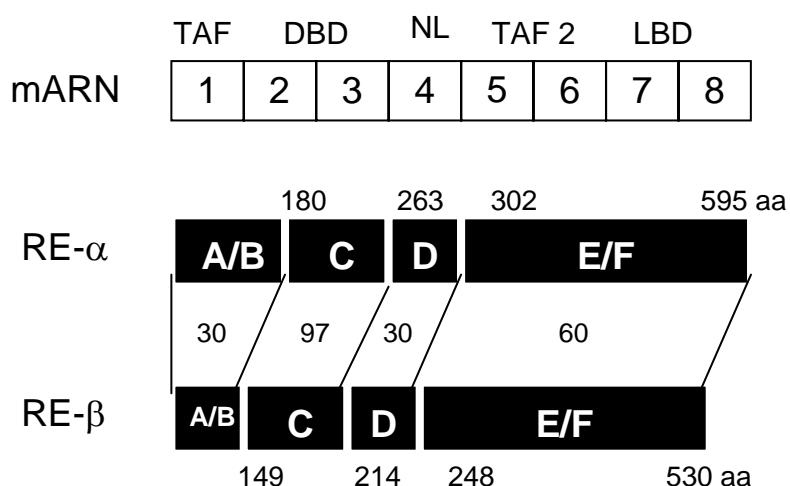


Fig. 3. Estructura del RE. Se observa el número de exones y regiones funcionales del RE. En la proteína se indican las diferentes regiones, el número de aminoácidos para cada isoforma y el porcentaje de homología entre ambas.

3.2.2 Isoformas del receptor a estrógenos

Se han identificado dos isoformas del RE denominadas RE- α y RE- β . El RE- α de 66 KDa formada por 595 aminoácidos, se localiza principalmente en mama, útero, hipotálamo, hipófisis y ovario; y se identificó en 1950 y muchos años después se purificó, en 1986, se caracterizó y clonó (Jensen et al, 2003; Batistatou et al, 2005); el RE- β de 55 KDa de 530 aminoácidos se expresa principalmente en riñón, timo, pulmón, bazo, hipotálamo, hipófisis, próstata, testículo, ovario, sistema digestivo, vejiga y glándula mamaria; se secuenció en 1996 inicialmente en roedores y después en testículo de humano (Kiuper et al, 1996; Mosselman et al, 1996).

Este nuevo descubrimiento hizo que se reevaluara el papel de los RE durante el desarrollo y la tumorigénesis (Batistatou et al, 2004). El RE- α y RE- β son altamente homólogos, aunque son producto de diferentes genes; el RE- α se localiza en el cromosoma 6q 25.1 y el RE- β en el cromosoma 14q 22-24 (Hall et al, 2001).

Ambos receptores exhiben seis dominios (A-F), los dominios C y E corresponden a las regiones correspondientes de unión al ADN y al ligando respectivamente, el dominio D posee la señalización para la localización nuclear. La identidad entre las dos secuencias es de 97% para el dominio de unión al ADN y de 60% para el dominio de unión al ligando (Fig. 4) (Bodo et al, 2006).

Se ha reportado que el RE- β está presente en neuronas del hipocampo y en astrocitos, además de tumores pituitarios en humanos. En algunos de estos tumores se expresa RE- α (Batistatou et al, 2004).

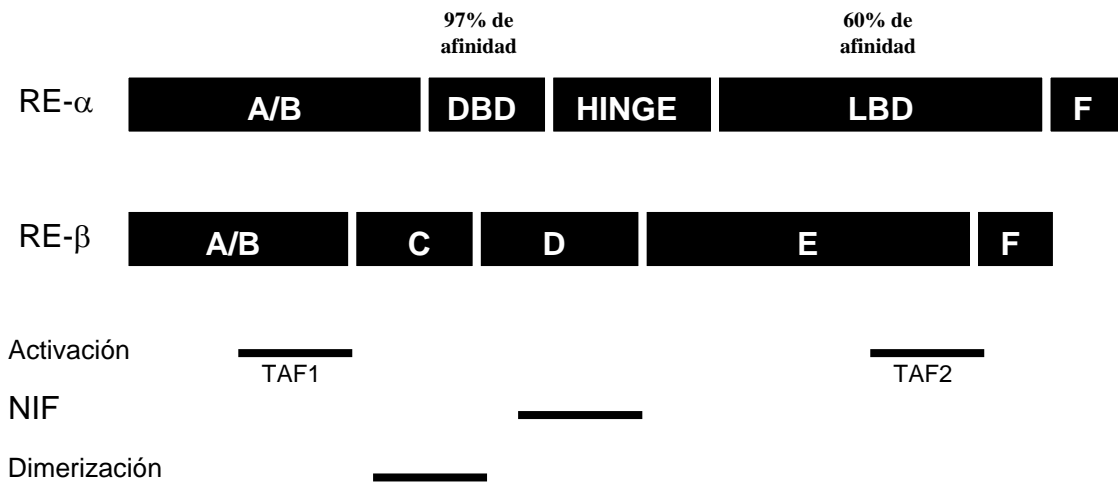


Fig. 4. Comparación de las isoformas del receptor a estrógenos. Presentan el 45% de homología, pero en el dominio de unión al ADN presentan 97% y en el dominio de unión al ligando el 60%. La isoforma α cuenta con 595 aminoácidos y la β con 530. TAF: función de activación; NIF: tipo de proteínas transportadoras; Hinge: bisagra; A-F: dominios del RE; DBD: dominio de unión al ADN; LBD: dominio de unión al ligando.

La estabilidad del RE, depende de la unión con su ligando, E_2 ; en su ausencia la vida media del receptor es de 5 días mientras que con E_2 es de 3-4 horas, esto es porque el receptor es degradado vía ubiquitina-proteosoma (Nawaz et al., 1999). En el caso del RE- β se ha demostrado que el E_2 incrementa la expresión del mRNA de manera dosis-dependiente en células de la capa decidual de útero de ratas (Tessier et al., 2000).

El antagonista para RE- α , ICI 182, 780, permite la interacción de proteínas de filamentos intermedios (citoqueratinas 8 y 18) con el receptor para inmovilizarlo y degradarlo, mientras que el RE- β mantiene resistencia a la degradación por ICI (Long y Nephew, 2006); por lo que el 17β -estradiol (en citoplasma) e ICI (en núcleo) presentan la habilidad para inducir la degradación del RE- α (Preisler et al., 2001; Calligé et al., 2006).

3.2.3 Antagonistas del receptor a estrógenos

Existen dos tipos de antagonistas del RE: los de tipo I o Moduladores Selectivos del RE y los de tipo II o puros. Los del tipo I son compuestos de

naturaleza no-esteroidal, en su mayoría análogos del tamoxifén o de sus metabolitos, siendo la forma 4-hidroxi-tamoxifén, el antiestrógeno más potente. Presentan propiedades agonistas y antagonistas y se denominan Moduladores Selectivos del RE, debido a que pueden actuar de manera diferente dependiendo del órgano blanco.

Dentro de los antagonistas tipo I están: a) tamoxifén que se usa como adyuvante de la quimioterapia, su uso se extendió para el tratamiento de pacientes pre y pos-menopáusicas con cáncer de mama avanzado que expresan el RE; b) toremifén o clorotamoxifen que es un fármaco con actividad antiestrogénica y antitumoral utilizado en pacientes con cáncer de mama avanzado o RE positivos; c) idoxifén compuesto derivado del tamoxifén es metabolitamente estable, no presenta efectos tóxicos en hígado y tiene actividad antiestrogénica y antitumoral; d) droloxifén funciona como un antitumoral en animales de laboratorio y en la clínica en mujeres posmenopáusicas con cáncer de mama avanzado (Barrón-González et al, 2001).

Los del tipo II son compuestos de naturaleza esteroidea, inhiben la acción de los estrógenos en todas las condiciones en las que han sido probados; estos compuestos tienen una alta afinidad por el RE e inhiben la acción de los estrógenos por competencia por este receptor. Su acción antiestrogénica se efectúa al impedir la dimerización de este receptor, lo cual no le permite su unión al ERE, y por lo tanto no induce la transcripción de los genes. Así mismo se ha demostrado que estos compuestos pueden bloquear la translocación del RE al núcleo, lo cual incrementa su degradación citoplásmica.

En este grupo se encuentra al Faslodex (ICI 182,780) es el único de los antiestrogénicos puros que ha sido probado en la clínica. Varios estudios clínicos han comprobado que este compuesto no tiene efecto estrogénico, reduce los niveles de expresión del receptor a progesterona (RP) y del RE en tumores de mama (Barrón-González et al, 2001), además se encuentran otros antagonistas del RE como el ICI 164,384, RU58,668 y el ZK-703.

3.3 Tumores del Sistema Nervioso Central

Los tumores cerebrales son patologías numerosas y con múltiples características que producen síntomas neurológicos como consecuencia de su tamaño, localización y cualidades invasivas que destruyen los tejidos donde se localizan. Durante mucho tiempo se han propuesto numerosos factores y teorías para explicar el origen de estas neoplasias (factores causales, traumatismos, infecciones, enfermedades metabólicas, exposición a toxinas, etc.). Sin embargo, aún en la actualidad no se conoce de manera clara su origen.

Los tumores del Sistema Nervioso Central (SNC) constituyen del 10 al 15% del total de las neoplasias que más frecuentemente se presentan en el ser humano (Felix, 1995). De acuerdo con sus características histológicas se dividen en primarios o secundarios. Los tumores primarios corresponden a las neoplasias más comunes, constituyendo del 50% al 60% de las neoplasias intracraneales (Valenzuela et al., 1990).

En general, los tumores cerebrales se presentan con mayor frecuencia en adultos entre los 30 y 50 años, y la mayoría se presentan indistintamente en hombres y en mujeres, sin embargo, se ha observado que los astrocitomas son más frecuentes en hombres y los meningiomas en mujeres.

Los tumores invaden y destruyen el tejido normal, afectando las funciones sensoriales, motoras y cognoscitivas, incrementan la presión intracraneal, forman edemas cerebrales y compresión de tejidos del cerebro, nervios craneales y vasos cerebrales. Entre todos los tumores que se pueden presentar en el SNC los más importantes desde el punto de vista clínico y los más frecuentes son los tumores de la neuroglía o gliomas (Tabla 1).

Tumores de células neurogliales:	<i>Astrocitomas, Oligodendrogliomas y Ependimoma</i>
Tumores formados por neuronas:	<i>Neurocitomas</i>
Tumores meningoteliales	<i>Meningiomas</i>
Tumores intracranianos de origen mesodérmico:	<i>Fibrosarcomas, Condromas, Linfomas, Hemangioblastomas</i>
Tumores de restos embrionarios y por defectos en el desarrollo:	<i>Craneofaringiomas, Cordomas, Meduloblastomas</i>
Tumores de la hipófisis:	<i>Adenomas</i>
Tumores de Plexos Coroideos:	<i>Papilomas de plexos coroides</i>
Tumores de las raíces nerviosas:	<i>Neurofibromas, Schwannomas</i>

Tabla 1. Clasificación de los tumores cerebrales

3.3.1 Astrocitomas

Los gliomas son tumores de origen neuroectodérmico, el sub-grupo más frecuente y más importante es el de los astrocitomas que se originan en los astrocitos (células gliales de forma estrellada y con grandes prolongaciones citoplasmáticas, se encuentran junto a vasos sanguíneos, oligodendrocitos, neuronas y sus prolongaciones); son tumores compuestos de astrocitos neoplásicos, se localizan en cualquier parte del encéfalo especialmente en la corteza cerebral; microscópicamente tiene una apariencia uniforme con alta actividad proliferativa (Nguyen et al, 1984).

Se han utilizado varios sistemas para clasificarlos según su grado de malignidad, siguiendo el sistema de Kernohan y cols., la OMS los ha clasificado en cuatro grados siguiendo los criterios morfológicos, histológicos, capacidad de invasión y progresión de la siguiente forma:

- Grado I o astrocitoma de bajo grado: Astrocitoma pilocítico
- Grado II o astrocitoma difuso: Astrocitoma fibrilar, protoplasmático y gemistocítico.
- Grado III o astrocitoma anaplásico.
- Grado IV o astrocitoma de alto grado: Glioblastoma multiforme, gliosarcoma y glioblastoma de células gigantes

Los astrocitomas grado I y II son benignos o de bajo grado de malignidad. Los de grado I son de crecimiento lento, con bordes relativamente bien definidos, crecen principalmente en cerebelo, rutas de nervio óptico, son tumores no infiltrantes que se presentan en los niños y adultos jóvenes, este tipo de tumores son usualmente curables por cirugía. Los astrocitomas de grado II son malignos de bajo-grado de infiltración difusa en el cerebro, bordes no definidos y no son curables por cirugía, muchos de estos tumores pasan a un grado mayor de evolución (Hullerman et al., 2005).

Los astrocitomas de grado III son multicelulares, células no uniformes, invaden los tejidos vecinos, presentan un notable pleomorfismo y anaplasia, con células multinucleadas y mitosis atípicas abundantes sin presentar extensas zonas de necrosis como en el grado IV. Son positivos a la prueba de la proteína fibrilar ácida glial. Los pacientes tienen una probabilidad de sobrevivencia del 50% aún con tratamiento de radioterapia.

Los astrocitomas de grado IV comúnmente llamados glioblastomas, pueden estar compuestos por diferentes tipos celulares como astrocitos, oligodendrocitos, presentan una rápida evolución, son malignos y están localizados preferentemente en los hemisferios cerebrales, ganglios basales y tálamo. Estos últimos llegan a medir hasta 5 cm, presentan áreas hemorrágicas con células redondas pequeñas, ovoides hasta agregados celulares grandes. Existe secreción de factores estimulantes de proliferación de vasos sanguíneos (factores angiogénicos) y presentan además células con grandes cantidades de filamentos, desprovistas de desmosomas y nucleolos prominentes. Las personas que desarrollan este grado de tumor tienen pocas esperanzas de vida con una tasa de sobrevivencia menor a 1 año (Hullerman et al., 2005).

3.3.2 Expresión del receptor a estrógenos en astrocitomas

El RE- β se expresa en algunas neuronas en el hipocampo y en astrocitos, además de algunos tumores pituitarios que también expresan RE- α (Chaidarun et al. 1998; Savaskan et al. 2001; Kruijver et al., 2002).

En cáncer de mama el RE- β protege de la actividad mitogénica de estrógenos modulando los efectos proliferativos del RE- α ; aunque el RE- α ha sido estudiado en varias neoplasias, su papel ha sido poco caracterizado. Hasta ahora no se ha identificado la expresión del RE- α en astrocitomas grado IV (González-Agüero et al., 2001); por lo que al parecer este receptor no se expresa de manera significativa en astrocitomas (Batistatou et al, 2004).

El RE- β es altamente expresado en astrocitos no neoplásicos y en astrocitomas de bajo grado (Batistatou et al., 2006); esta expresión disminuye conforme aumenta el grado del tumor, parece que el RE- β es el único RE expresado en astrocitos, y su desregulación podría ser de crucial importancia para la progresión de los tumores astrocíticos (Batistatou et al, 2004).

4. Planteamiento del problema

- ◆ No se ha determinado la expresión y regulación de las isoformas del RE en líneas celulares de astrocitomas humanos, a pesar de que se sabe que el contenido de la isoforma β disminuye dependiendo el grado de evolución de los astrocitomas, por lo que en este proyecto se determinará el contenido de las isoformas del RE y su regulación por E_2 y el antiestrógeno ICI 182,780 en líneas de astrocitomas humanos.

5. Hipótesis

- ◆ Si el E_2 regula negativamente a su receptor entonces el contenido de las isoformas del RE disminuirá con la administración de esta hormona.
- ◆ Si se administra E_2 conjunto con un antagonista para este receptor, entonces se espera que haya una disminución mayor del RE.

6. Objetivo

Determinar el contenido de las isoformas del RE en líneas celulares de astrocitomas humanos grados III y IV, antes y después del tratamiento con E_2 y/o con un antagonista específico del RE

7. Materiales y Métodos

7.1 Cultivo Celular

Líneas celulares de astrocitomas humanos (D54 y U373) fueron cultivadas en medio DMEM-rojo fenol, adicionado con suero bovino fetal al 10% hasta obtener el 80% de confluencia (aproximadamente una semana). Una vez obtenida la confluencia se contaron las células en una cámara de Neubauer y se colocaron 500 000 células en medio DMEM-rojo fenol durante 24 horas. Después de ese tiempo se realizó un cambio por un medio DMEM sin rojo fenol suplementado con suero bovino fetal al 10% libre de hormonas durante 24 horas.

Para determinar los efectos del E₂ sobre el contenido del RE en las líneas celulares se utilizaron los siguientes compuestos: Vehículo (V); ciclodextrina 30 nM en agua estéril; E₂ (10 nM) acoplado a ciclodextrina; ICI 182,780 (antagonista de RE) (2 µM) en DMSO 10X (dosis de 1-10 µM inhiben la expresión del RE (Martin, et al., 2005; King-Mang, et al., 2000; García-López et al., 2000; González-Arenas et al., 2006;); E₂ + ICI 182,780 por 24 horas.

7.2 Extracción de Proteínas totales

Las células se lisaron con buffer de Laemmli 2X (Tris-Base 12 mM, pH 6.8, azul de bromofenol 0.1%, glicerol %, SDS 2.5%, β-mercaptoetanol 5%) y se hicieron cinco pases en una jeringa con aguja de 21 x 25 mm; para después ser almacenados a 4°C en tubos ependorff, y posteriormente separar las proteínas por electroforesis.

7.3 Inmunoprecipitación

Para obtener el control de detección del RE-α se realizó una inmunoprecipitación, que es una técnica que consiste en concentrar al máximo la proteína de interés y después realizar el inmunoblot, para lo cual se lisó 1.0 g

de útero de rata y de ahí se extrajeron 2 mg de proteína total, la cual se dejó inmunoprecipitando en tubo ependorff toda la noche a 4°C con 10µl (2µg) de anticuerpo anti-RE α (Santa Cruz) y 45 µl proteína A-sefarosa.

Posteriormente se centrifugó por 5 min a 13000 rpm en la microfuga, se retiró el sobrenadante y el pellet se resuspendió con 60 µl de buffer de Laemmli 2X (descrito anteriormente).

7.4 Western Blot

Las proteínas obtenidas de las células (70 µg) se separaron por electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida SDS-PAGE al 10% a 30 mA durante 2 horas. Cada muestra se preparó con buffer de Laemmli y 40 µl de proteína y se hirvieron durante 5 min para cargarlas en los geles antes mencionados. Las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (Amersham) a 60 mA, durante 1 hora y media en una cámara semihúmeda. Posteriormente, las membranas fueron bloqueadas por 2 horas a temperatura ambiente con una solución de leche descremada en polvo al 5% en TBS 1X (NaCl, Tris-Base, pH 7.5) + tween 0.1%.

Las membranas fueron incubadas durante toda la noche a 4°C con los siguientes anticuerpos: anticuerpo primario monoclonal anti RE- α (RE- α (F-10), Santa Cruz sc-8002) y anticuerpo primario policlonal anti RE- β (RE- β (Y-19), Santa Cruz sc-6821) en una concentración de 0.8 µg/ml. Las membranas fueron lavadas con TBS-Tween (TBS (pH 7.5) + Tween al 0.1%) 3 veces por cinco minutos. Las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario anti-ratón acoplado a peroxidasa (IgG-HRP) para RE- α (Santa Cruz sc-2005) anticuerpo secundario anti-conejo acoplado a peroxidasa (IgG-HRP) para RE- β (Santa Cruz sc-2030) en una concentración 1:3000. Se utilizó un método de detección quimioluminiscencia de alta sensibilidad (ECL, Amersham Pharmacia Biotech) para determinar la presencia de las proteínas estudiadas. Con este sistema, el peróxido de luminol y un activador son sustrato de la peroxidasa acoplada al anticuerpo secundario que cuando reacciona se genera una señal de quimioluminiscencia al exponer las membranas a placas radiográficas.

Para corregir las posibles diferencias en la cantidad de proteína cargada, las membranas se incubaron con anticuerpo primario anti- α -tubulina en una concentración de 1:10,000 (Sigma) durante dos horas a temperatura ambiente, las membranas se lavaron 3 veces por 5 minutos con TBS-Tween, después se incubaron 45 minutos con anticuerpo secundario anti-ratón acoplado a peroxidasa en una concentración de 1:3000 y posteriormente se utilizó el método de alta sensibilidad (antes descrito).

7.5 Análisis de Resultados

Cada placa fue sometida a un análisis densitométrico para cuantificar las bandas de las proteínas estudiadas mediante el programa ChemImager 4400. A los datos obtenidos se les aplicó una prueba de ANOVA y posteriormente una prueba U de Mann-Whitney, se utilizó el programa Prism 2.01 (Graph Pad, CA) para calcular los valores de probabilidad.

8. Resultados

En este trabajo se estudió el efecto del E₂ sobre el contenido de las isoformas del RE en líneas celulares de astrocitoma humano U373 y D54 (grado III y IV respectivamente).

En la figura 5 se muestran dos blots resultado de la inmunoprecipitación para demostrar la presencia de las isoformas del RE. En ellos se localizó una banda de 66 KDa que corresponde al peso de la isoforma RE- α y otra banda de 55 KDa correspondiente al RE- β , lo cual indica que las dos líneas celulares son positivas para la expresión de ambas isoformas.

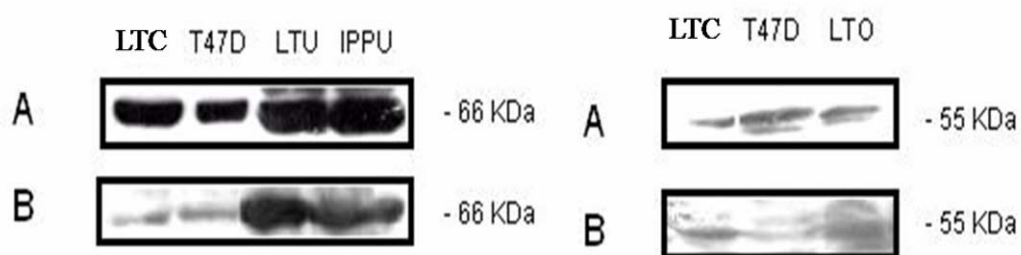


Fig. 5. Identificación de las isoformas receptor a estrógenos (RE- α y RE- β) por Western Blot en células de astrocitoma humano grados III U373 (A) y grado IV D54 (B). Lisado total celular de astrocitomas (LTC), Lisado total de útero (LTU), Lisado total de ovario (LTO), Inmunoprecipitado de útero (IPPU); T47D Línea celular de adenocarcinoma mamario humano.

Una vez que se han identificado ambas isoformas del RE en las líneas celulares, mediante la técnica de Western Blot se determinó el contenido de las isoformas después de los tratamientos de Vehículo, E₂, ICI e ICI+E₂.

En la figura 6 se observó que en la línea U373 hay una regulación a la baja con los distintos tratamientos respecto al vehículo, mientras que en la línea D54 sólo se observó esta regulación a la baja con los tratamientos de ICI e ICI+E₂.

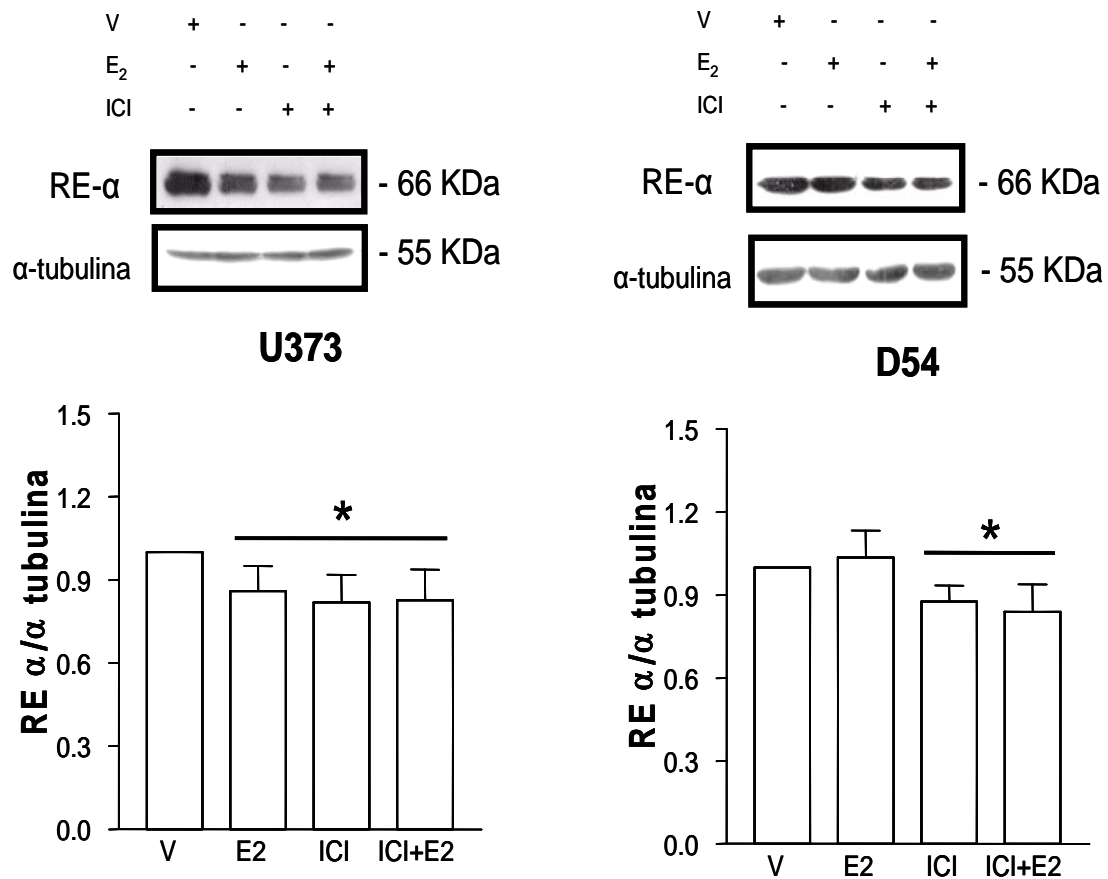


Fig. 6. Regulación del contenido del RE-α en las líneas celulares U373 y D54. Se realizaron tres experimentos independientes de cada línea celular. La isoforma fue detectada por la técnica de Western Blot se cuantificó por medio de un análisis densitométrico y los valores se corrigieron con respecto a los obtenidos con el control de carga (tubulina). * $p < 0.05$ vs V.

En el caso del RE-β se observó una regulación similar después del tratamiento con E₂ e ICI en ambas líneas celulares. El agonista y el antagonista incrementaron el contenido del RE-β. De manera interesante el tratamiento conjunto del E₂ e ICI disminuyó el contenido del RE-β (Fig. 7).

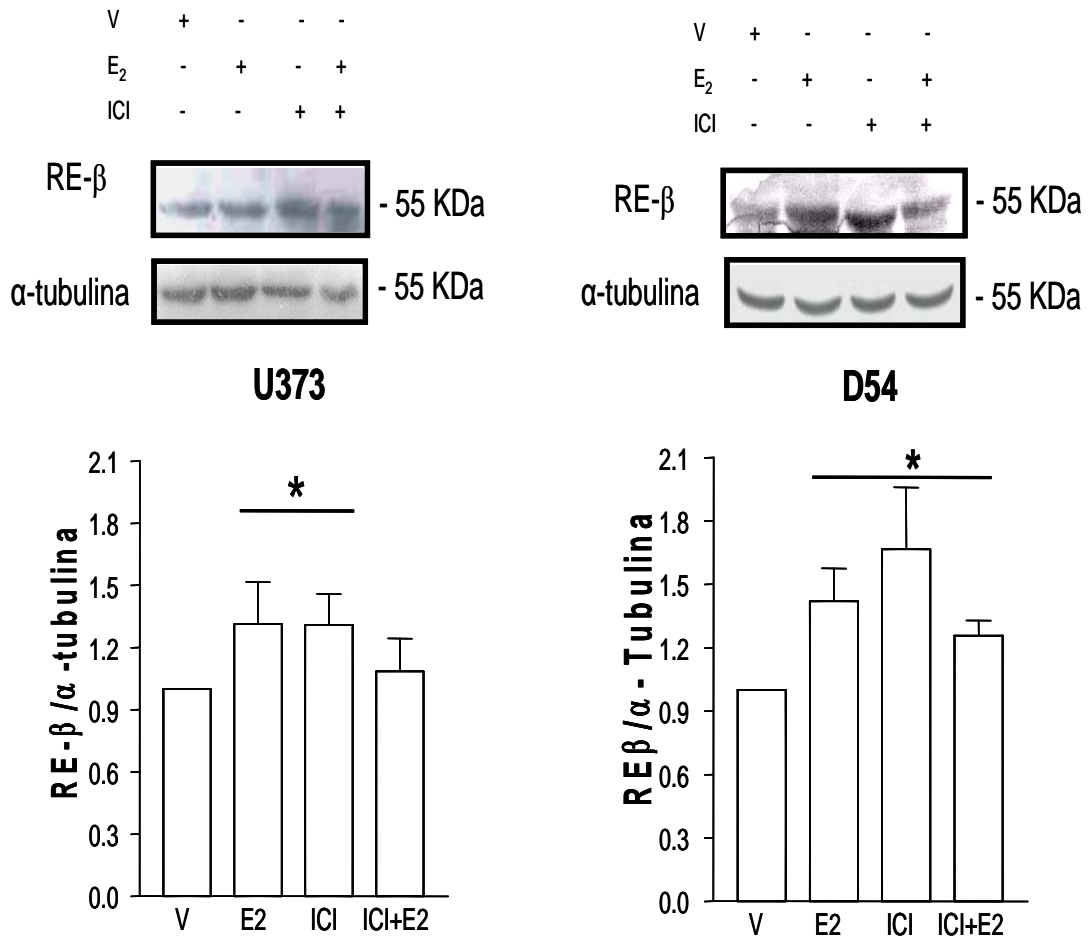


Fig. 7. Contenido del RE-β en las líneas celulares de astrocitomas humanos U373 y D54. Análisis del contenido de la isoforma del RE-β. * p < 0.05 vs V.

9. Discusión

En este trabajo se determinó el efecto del E_2 y del agente antiestrogénico ICI 182, 780, sobre el contenido de las isoformas del RE en líneas celulares de astrocitomas humanos de grados III (U373) y IV (D54) de evolución.

Se observó que el E_2 regula a la baja el contenido de la isoforma RE- α en la línea U373, esto sugiere que el E_2 se encuentra activando la vía ubiquitina-proteosoma provocando la degradación del receptor; mientras que en la línea D54 no se observan efectos significativos; en tanto la administración de ICI e ICI+ E_2 regularon a la baja esta isoforma en ambas líneas celulares, lo cual indica que el ICI impide la movilización del receptor hacia el citoplasma, y pareciera que el tratamiento conjunto ejerce un efecto sinérgico en la inmovilización y degradación del receptor (Calligé et al., 2006).

Para la isoforma RE- β se observa que el E_2 y el ICI regulan a la alta la expresión de esta isoforma en ambas líneas y en la línea D54 con el tratamiento conjunto se observa una regulación a la alta. Lo cual indica que la regulación es a la alta por su ligando así como de la acción del antagonista.

En estudios previos en células MCF-7 de cáncer de mama, el tratamiento con ICI después de 18 horas regula a la baja la expresión del RE- α (Sukosheva et al., 2006), comportamiento que también observamos en las líneas celulares de astrocitomas U373 y D54; mientras que para la isoforma RE- β , Martin et al., 2005, en la misma línea celular, MCF-7, tratada con el ICI muestran no haber cambios significativos en la expresión de esta isoforma lo mismo que observamos en la línea U373.

Como se mencionó anteriormente el E_2 tiene diversos efectos fisiológicos como regular al proliferación. En cuanto a las isoformas del RE el E_2 puede modular la expresión de ambas isoformas intensificando o disminuyendo sus acciones en tejidos blanco; se sabe que en células MFC-7

regula a la baja los niveles de RE- α mientras que en la regulación incrementa en los niveles del mRNA del RE- β y esto ha sido observado en las líneas de cáncer de mama T47D, de cáncer de próstata DU145 y de cáncer de colon DLD-1 (Caiazza et al., 2007).

En 2001, González-Agüero et al., reportaron la ausencia de la expresión de la isoforma RE- α en astrocitomas de grado IV, con los datos obtenidos en este trabajo se demuestra la presencia de esta isoforma en la línea D54 que, como se mencionó anteriormente, corresponde al grado de evolución IV. En cuanto a la expresión de ambas isoformas en las dos líneas celulares se observó que en la línea de menor grado de evolución, U373, es predominante la isoforma RE- α y una menor expresión de la isoforma RE- β como lo reportado por González-Arenas et al., 2006.

10. Conclusiones

- La regulación de las isoformas del RE es de manera ligando-dependiente, donde el E₂ y el ICI regulan a la baja la expresión del RE- α y el RE- β es regulado a la alta.
- El efecto diferencial de la expresión de la isoformas con E₂ y el ICI está dado por sus diferentes mecanismos de acción (Fig. 8).
- La regulación de las isoformas del RE en las líneas celulares U373 y D54 con los diferentes tratamientos es similar.

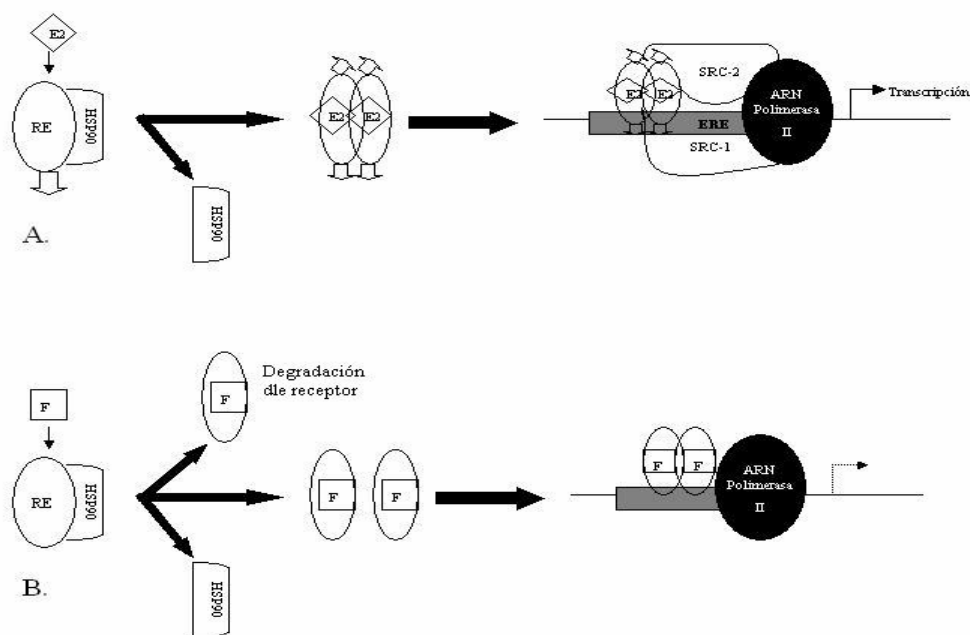


Fig. 8. **A.** Mecanismo de acción del E₂. La E₂ se une con alta afinidad al RE y disocia la HSP90, el complejo E₂-RE se homodimeriza; este homodímero se une al ERE en la región promotora; la activación de la transcripción implica la interacción de SRC-1 y 2 con sus SRC-1 y 2 para estimular la actividad de la ARN polimerasa II. **B.** Mecanismo de acción del Faslodex (F). El F se une con similar afinidad que el E₂ y disocia la HSP90; hay una degradación del RE por F y se reduce la tasa de dimerización; y finalmente se reduce la unión del complejo F-RE al ERE. (Modificado de Howell et al., 2000).

11. Referencias

- ❖ Barrón-González A, Arias-Martínez J, Castro-Romero I. Antiestrógenos: mecanismo de acción y aplicaciones clínicas. *Salud Pública Mex* 43:577-584 (2001)
- ❖ Batistatou A, Stefanou D, Goussia A, Arkoumani E, Papavassiliou AG, Agnantis NJ. Estrogen receptor beta (ERbeta) is expressed in brain astrocytic tumors and declines with dedifferentiation of the neoplasm. *J Cancer Res Clin Oncol.* 130(7):405-10 (2004)
- ❖ Batistatou A, Kyzas PA, Goussia A, Arkoumani E, Voulgaris S, Polyzoidis K, Agnantis NJ, Stefanou D. Estrogen receptor beta (ERbeta) protein expression correlates with BAG-1 and prognosis in brain glial tumours. *J Neurooncol.* 77(1):17-23 (2006)
- ❖ Bjornstrom L, Sjoberg M. Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes. *Mol Endocrinol.* 19(4):833-42 (2005)
- ❖ Bodo C, Rissman E. New roles for estrogen receptor β in behavior and neuroendocrinology. *Neuroendocrinology* 27:217-232 (2006)
- ❖ Caiazza F, Galluzo P, Lorenzetti S, Marino M. 17β .estradiol induce ER β up.regulation via p38/MAPK activation in colon cancer cells. *BBRC* 359:102-107 (2007)
- ❖ Callige M, Richard-Foy H. Ligand-induced estrogen receptor alpha degradation by the proteasome: new actors? *Nucl Recept Signal.* 4:e004 (2006)
- ❖ Camacho-Arroyo I., Pasapera A.M., Pérez-Palacios G., Cerbón M.A. Progesterone and its metabolites in central nervous system function. *Rev. de Invest. Clin.* 47, 329-340 (1995)
- ❖ Camacho-Arroyo I., Guerra-Araiza C., Cerbón MA. Progesterone receptor isoforms are differentially regulated by sex steroids in the rat forebrain. *Neuroreport.* 9(18), 3993-3996 (1998)

- ❖ Camacho-Arroyo I. Progesterone receptor isoforms expression and progesterone actions in the brain. *Recent Research in Developmental Life Sciences*. 1, 221-242 (2003)
- ❖ Chaidarun S. S, Swearingen B, Alexander J. M. Differential expression of estrogen receptor-beta (ER beta) in human pituitary tumors: functional interactions with ER alpha and a tumor-specific splice variant. *J Clin Endocrinol Metab*. 83(9):3308-15 (1998)
- ❖ Clavo B, Robaina, F, Macías D, González G, Hernández M. A., Lara P. C. Tumores del Sistema Nervioso Central. *Biocáncer.com Revista electrónica de formación en oncología*. Volumen no. 1- Enero 2004 ISSN 1697-6452
- ❖ Devlin, TM. (Ed.). *Bioquímica. Libro de texto con aplicaciones clínicas (Tomos I y II)*. Editorial Reverté, SA. Barcelona, 1988
- ❖ Félix I. A. 1995. *Atlas de Neuropatología Vol. I Ed. Auroch, México D. F.* 1-150 pp.
- ❖ Garcia-Lopez P, Rodriguez-Dorantes M, Perez-Cardenas E, Cerbon M, Mohar-Betancourt A. Synergistic effects of ICI 182,780 on the cytotoxicity of cisplatin in cervical carcinoma cell lines. *Cancer Chemother Pharmacol*. 53(6):533-40 (2004)
- ❖ Goodman y Gilman. *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. (9ª edición). Volumen II. Editorial MacGraw-Hill. Interamericana
- ❖ González-Arenas A. A., Reyna-Neyra A., Gomez M. J, Mendez, I., Larrieta-Carrasco M. E., Haces M. L., Jiménez B, Camacho-Arroyo I. Los mensajeros químicos del sistema neuroendócrino. *Edu. Quím*. 3: 158-162 (2001)
- ❖ González-Arenas A, Aguilar-Maldonado B, Avendaño-Vázquez S. E, García-Saíenz J. Estrogens cross-talk to α_{1b} – Adrenergic receptors. *Mol. Pharmacol*. 70,154-162 (2001)

- ❖ Graham J. D, Clarke C. L. Physiological action of progesterone in target tissues. *Endocrinol. Rev.* 18, 502-519 (1997)
- ❖ Greenspan F. S, Strewler G. J. *Endocrinología básica y clínica. Manual Moderno, México, pp. 967 (1998)*
- ❖ Hall J. M, Couse J. F, Korach K. S. The multifaceted mechanisms of estradiol and estrogen receptor signaling. *J Biol Chem.* 76(40):36869-72 (2001)
- ❖ Hulleman E, Helin K. Molecular mechanisms in gliomagenesis. *Adv Cancer Res* 94:1-27
- ❖ Jensen E. V, Jordan V. C. The estrogen receptor: A model for molecular medicine. *Clin. Cancer Res.* 9, 1980-1989 (2003)
- ❖ Kastner P, Krust A., Turcotte B., Stropp U, Tora L, Gronemeyer H, Chambon P. Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B. *EMBO Journal* 9, 1603-1614 (1990)
- ❖ Kuiper G. G, Enmark E, Pelto-Huikko M, Nilsson S, Gustafson J. A. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93, 5925-5990 (1996)
- ❖ Knobil, E. The hypothalamic gonadotrophic hormone releasing hormone (GnRH) pulse generator in the rhesus monkey and its neuroendocrine control. *Human Rep.* 3, 29-31 (1988)
- ❖ Knobil E., Neil J. *The Physiology of Reproduction.* Raven Press, New York, pp. 3250 (1998)
- ❖ Kruijver F. P, Baleasar R, Espila A. M, Unmehopa U. A, Swaab D. F. Estrogen receptor alpha distribution in human hypothalamus in relation to sex and endocrine status. *J. Comp. Neurol.* 454 : 115-139 (2002)
- ❖ Martin L. M, Pancholi S, Chan C. M. W, Farmer I, Kimberley I, Dowsett M, Johnston S. R. D. The anti-oestrogen ICI 182, 780, but not tamoxifen, inhibits the growth of MCF-7 breast cancer cells refractory to long-term

- oestrogen deprivation through down-regulation of oestrogen receptor and IGF signalling. *Endocrine-Related Cancer* 12:1017-1036 (2005)
- ❖ Miñano A. J. El 17- β -estradiol frente a la muerte apoptótica en neuronas granulares del cerebelo: efectos sobre la supervivencia y modulación de la plasticidad neuronal. Tesis Doctoral. Bañaterra 2006
 - ❖ Mosselman S, Polman J, Dijkema R. RE- β : identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Lett* 392, 49-53 (1996)
 - ❖ Nawaz Z, Lonard D. M, Dennis A. P, Smith C. L, O'Malley B. W. Proteasome-dependent degradation of the human estrogen receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2;96(5):1858-62 (1999)
 - ❖ Nguyen J. P, Caron J. P, Gaston A, Lovarn R, Poirier J. Anatomoradiological correlations in astrocytic cerebral tumors. *Neurochirurgie* 30(1): 11-15 (1984)
 - ❖ Preisler-Mashek M. T, Solodin N, Stark B. L., Tyrivier M. K, Alarid E. T. Ligand-specific regulation of proteasome-mediated proteolysis of estrogen receptor- α . *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282: E891-E898 (2002)
 - ❖ Prieto A., Villamar-Cruz O., Saqui-Salces M., Neri-Gomez T., Almaraz-Nieves A., Hernández-Molina V.I., Valdez-Rodriguez, H, Camacho-Arroyo I. Como Actúan las hormonas esteroides. *Edu. Quím.* 14(4), 196-201 (2003)
 - ❖ Savaskan E, Olivieri G, Meier F, Ravid R, Muller-Spahn F. Hippocampal estrogen beta-receptor immunoreactivity is increased in Alzheimer's disease. *Brain Res.* 27; 908(2):113-9 (2001)
 - ❖ Schwartz J. A., Zhong L., Deighton-Collins J., Zhao C., Skafar D. Mutations targeted to predicted helix in the extreme carboxyl-terminal region of the human estrogen receptor- α after its response to estradiol and 4-hidroxytamoxifen. *J. of Biol. Chem.* 277, 13202-13209 (2002)

REFERENCIAS

- ❖ Sukosheva O, Wadham C, Holmes A, Albanese N, Verrier E, Feng F, Bernal A., Derian C, Ullrich A, Vadas M, Xia P. Estrogen transactivates EGFR via sphingosine 1-phosphate receptor Edg-3: the role of sphingosine kinase-1. *Journal of Cell Biol.* 173, 301-310 (2006)
- ❖ Tata J. R. Signalling through nuclear receptors. *Nat. Rev. of Mol. and Cell. Biol.* 3, 702-710 (2002)
- ❖ Tessier C, Deb, Prigent-Tessier A., Ferguson-Gottschall S, Gibori G. B. Shiu R. P, Gobori G. estrogen receptors alpha and beta in rat deciduas cells: cell-specific expression and differential regulation by steroid hormones and prolactin. *Endocrinology* 141(10): 3842-3851 (2000)
- ❖ Tsutsui K, Ukena K, Usui M, Sakamoto H, Takase M. novel brain function: biosynthesis and actions of neurosteroids in neurons. *Neurosci. Res.* 36:261-273 (2000)
- ❖ Valenzuela Z., 1990. Neuropatología de meningiomas serie del Hospital de Especialidades Centro Medico la Raza, 1980-89 (10 años) pp 58.
- ❖ Wilson J. D., Foster D. W., Williams J. Textbook of Endocrinology. Ed Saunders Company, Philadelphia. Pp. 35-164 (1992)
- ❖ Zwain I. H, Yen S. S. Neurosteroidogenesis in astrocytes, oligodendrocytes, and neurons of cerebral cortex of rat brain. *Endocrinology* 140:3843-3852 (1999)