



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

UN/M  
POSGRADO 

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO  
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

“EFECTOS DE LA PROGESTERONA Y DEL ESTRADIOL  
SOBRE LA EXPRESIÓN DE LOS COACTIVADORES SRC-1 Y  
SRC-3 EN LAS LÍNEAS CELULARES DE ASTROCITOMAS  
HUMANO U373  
Y D54”

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

BIÓL. OLIVIA TANIA HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ

TUTOR: DR. IGNACIO CAMACHO ARROYO



MÉXICO, D.F.

2008



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.

La realización de la presente tesis fue posible gracias al apoyo económico brindado por CONACYT (proyecto 43224), bajo la dirección del Dr. Ignacio Camacho Arroyo en el Departamento de Biología de la Facultad de Química, UNAM.

## **Agradecimientos**

### **Dr. Ignacio Camacho:**

El conocer que eres una persona comprometida con tu trabajo, además, de poseer una gran calidad humana resulta motivante para continuar por este camino. Gracias por ser un buen tutor, por la confianza demostrada, por proporcionarme los elementos necesarios para la realización del trabajo experimental y principalmente por la formación académica.

### **Dra. Patricia de Gortari y Dr. Iván Velasco:**

Agradezco el interés que siempre mostraron para la realización de este trabajo, el cual se fue afinando y se concluyó gracias a sus sugerencias.

**Edith:**

¡Que bueno que me pusieron en tus manos!... gracias por tu tiempo.

Y lo mejor de todo es que me has brindado tu amistad.

A los futuros investigadores o a los que ya empezaron **Milena, Aliesha, Carolina, Luciano y Mauricio**, gracias por sus enseñanzas, sugerencias y amistad. ¡Son magnificas personas!.

## **Dedicatoria**

### **Guadalupe:**

Mamá me has demostrado nuevamente que con voluntad, esperanza, constancia y amor se puede obtener lo que se anhela aún en las condiciones más adversas. Tenemos otra oportunidad de estar juntas... gracias. Te amo.

### **Abuelita:**

Entre más años, eres más fuerte, sabia y generosa, pero siempre te has mantenido con un gran corazón. Gracias por tu cariño.

**Octavio:**

Cada vez que tenga oportunidad te lo voy a recordar  
y este es un buen momento,  
te amo y me siento una persona muy afortunada porque estamos juntos.  
Gracias, por hacerme muy feliz; por compartir tus vivencias las cuales son  
y seguirán siendo ejemplo y motivación en mi proceder;  
por tu presencia y amor que es lo que me ha dado fuerza para seguir adelante  
(y más aún en los momentos difíciles); por tus palabras que me han  
reconfortado y alentado en un sin fin de ocasiones.

**Aimée y Sandra:**

Mis hermanas, así las veo y así se han mostrado conmigo, gracias por su cariño y por su presencia en los momentos de dicha y en los tiempos difíciles (donde la han hecho más evidente)... las quiero.

**Libo, Everardo, Rosa, Jacsani, Ana, Marcela y Chely:**

Gracias por seguir leales a nuestra amistad... los quiero.

<b>INDICE</b>	
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>II. RESUMEN</b>	<b>2</b>
<b>III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	<b>3</b>
<b>IV. ANTECEDENTES</b>	
4.1 Hormonas esteroides	<b>4</b>
4.2 Receptores a hormonas esteroides	<b>6</b>
4.3 Correguladores	<b>9</b>
4.3.1 Coactivadores	<b>10</b>
4.3.2 Coactivadores de receptores a hormonas esteroides (SRC)	<b>12</b>
4.4 Expresión de correguladores en líneas celulares de cáncer	<b>17</b>
4.5 Astrocitomas	<b>18</b>
<b>V. OBJETIVOS</b>	<b>21</b>
<b>VI. HIPÓTESIS</b>	<b>22</b>
<b>VII. METODOLOGÍA</b>	
7.1 Cultivo celular	<b>23</b>
7.2 Extracción de proteínas	<b>23</b>
7.3 Western Blot	<b>24</b>
7.4 Extracción de RNA total	<b>25</b>
7.5 Oligonucleótidos para RT-PCR	<b>26</b>
7.6 RT-PCR	<b>27</b>
7.6.1 Síntesis de cDNA	<b>27</b>
7.6.2 PCR	<b>27</b>
7.7 Análisis estadístico	<b>28</b>
<b>VIII. RESULTADOS</b>	
8.1 Expresión del RNAm de SRC-1 y SRC-3 en las líneas celulares de astrocitomas humano U373 y D54	<b>29</b>
8.2 Contenido de la proteína de SRC-1 y SRC-3 en las líneas celulares de astrocitomas humano U373 y D54	<b>34</b>
<b>IX. DISCUSIÓN</b>	<b>39</b>
<b>X. CONCLUSIONES</b>	<b>44</b>
<b>XI. REFERENCIAS</b>	<b>45</b>

## I. INTRODUCCIÓN

Las hormonas esteroides como la  $P_4$  y el estradiol  $E_2$  participan en la regulación de diversos procesos fisiológicos en el cerebro de los mamíferos, entre los que están la excitabilidad neuronal, la neuroprotección, la diferenciación y el control de la conducta sexual. Diversos estudios han reportado que la  $P_4$  y el  $E_2$  son reguladores clave en el desarrollo y progresión de diversos tipos de tumores. La acción de la  $P_4$  y el  $E_2$  está mediada por sus receptores intracelulares, el receptor a progesterona y el receptor a estrógenos. Estos receptores son miembros de la superfamilia de receptores nucleares, los cuales funcionan como factores de transcripción que regulan la expresión de diversos genes. Las acciones biológicas de las hormonas esteroides mediadas por sus receptores requieren de la maquinaria de transcripción basal y de proteínas reguladoras denominadas corre reguladores; estas proteínas pueden activar (coactivadores) o reprimir (correpresores) la actividad transcripcional. Se ha reportado que los corre reguladores intervienen en la unión de los receptores a hormonas esteroides con la maquinaria de transcripción y modifican la estructura de la cromatina regulando la transcripción.

Se han caracterizado varios corre reguladores, entre los que se encuentran los coactivadores SRC-1 y SRC-3. Existe evidencia de que algunos corre reguladores son regulados por  $P_4$  y  $E_2$ . Estudios en nuestro laboratorio han demostrado que el contenido de SRC-1 aumenta en el pulmón de la rata durante el diestro y disminuye en el proestro y estro, mientras que disminuye en el hipotálamo durante el diestro, pero aumenta durante el proestro y estro. También se ha demostrado en la línea celular de cáncer de mama MCF-7 que la expresión a nivel de la proteína de SRC-1 aumenta con el tratamiento de  $E_2$  (durante 24 h) y la expresión del RNAm y de la proteína de SRC-3 disminuye con  $E_2$  después de 4 h de tratamiento. Sin embargo se desconoce si la  $P_4$  y el  $E_2$  regulan la expresión de SRC-1 y SRC-3 en líneas celulares de astrocitomas humanos U373 y D54 (grado III y IV de evolución tumoral respectivamente). Por lo que en este trabajo se determinó el patrón de expresión de dichos coactivadores y su regulación por  $P_4$  y  $E_2$ .

## II. RESUMEN

La progesterona ( $P_4$ ) y el estradiol ( $E_2$ ) participan en la regulación de diversos procesos fisiológicos en el cerebro de los mamíferos. La acción de la  $P_4$  y el  $E_2$  está mediada por sus receptores intracelulares, el receptor a progesterona y el receptor a estrógenos. Las acciones biológicas de las hormonas esteroides a través de sus receptores requieren además de la maquinaria de transcripción basal, de otras proteínas reguladoras denominadas corre reguladores; estas proteínas pueden activar (coactivadores) o reprimir (correpresores) la actividad transcripcional. Se han caracterizado varios corre reguladores, entre los que se encuentran los coactivadores de receptores a hormonas esteroides (SRC-1 y SRC-3).

Cambios en el nivel y patrón de expresión de corre reguladores pueden afectar la actividad transcripcional de los receptores a hormonas esteroides y por lo tanto, participar en el desarrollo de enfermedades como el cáncer. Existe evidencia de que SRC-1 y SRC-3 son regulados por  $E_2$  y  $P_4$ , sin embargo se desconoce si estas hormonas esteroides regulan la expresión de SRC-1 y SRC-3 en líneas celulares de astrocitomas humanos U373 y D54 (derivadas de tumor grado III y IV respectivamente). Por lo que en este trabajo se determinó la expresión de SRC-1 y SRC-3 en estas líneas celulares y su regulación por  $E_2$  y  $P_4$ , mediante las técnicas de RT-PCR y Western blot. En la línea celular D54 el tratamiento con  $P_4$  durante 12 h aumentó significativamente la expresión del RNAm de SRC-1. El contenido de la proteína de SRC-1 aumentó con  $P_4$  a las 24 h, mientras que disminuyó significativamente 48 h después de la administración de  $P_4$  en la línea celular D54. Estos datos sugieren que la  $P_4$  regula la expresión de SRC-1, pero no la de SRC-3, en la línea celular D54. La  $P_4$  no modificó la expresión de SRC-1 o de SRC-3 en la línea celular U373. Por otro lado, el  $E_2$  no mostró un efecto sobre la expresión de los dos coactivadores en ninguna de las dos líneas celulares. Estos resultados sugieren que la expresión del coactivador SRC-1 es regulada por  $P_4$  en la línea celular de astrocitoma humano D54 que corresponde al mayor grado de evolución tumoral.

### **III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Se ha caracterizado la expresión de correguladores en varias líneas celulares de cáncer tratadas con  $P_4$  y  $E_2$ , por ejemplo, la expresión a nivel de proteína de SRC-1 aumentó en presencia de  $\beta$ -estradiol en la línea celular de cáncer de mama MCF-7 (Fleming et al., 2004). Estos resultados sugieren que algunos correguladores son regulados por estas hormonas. Sin embargo, se desconoce si la  $P_4$  y el  $E_2$  regulan la expresión de correguladores en líneas celulares de astrocitomas humanos de grado III (U373) y grado IV (D54). En este trabajo se determinó la expresión de SRC-1 y SRC-3 y su regulación por la  $P_4$  y el  $E_2$  en dichas líneas celulares.

## IV. ANTECEDENTES

### 4.1 Hormonas esteroides

Las hormonas esteroides son lípidos no saponificables hidrofóbicos solubles en solventes orgánicos. Estructuralmente presentan un núcleo básico denominado ciclopentanoperhidrofenantreno formado por tres anillos de seis átomos de carbono y un anillo de cinco átomos de carbono. Las hormonas esteroides, con excepción del ácido retinoico, se derivan del colesterol, a partir del cual se forma pregnenolona, que funciona como el principal intermediario para la síntesis de las hormonas esteroides (Figura 1). La degradación de hormonas esteroides ocurre a nivel hepático y requiere la participación de reductasas que actúan en el anillo A de la molécula, además de la posterior formación de glucoronidos. Los estranos (como el estradiol) pueden también degradarse por la formación de compuestos sulfatados (Knobil y Neil, 1988).

El estradiol ( $E_2$ ) y la progesterona ( $P_4$ ) son hormonas esteroides involucradas en la regulación de diversas funciones en los mamíferos. La  $P_4$  y el  $E_2$  son sintetizados principalmente en el ovario, la glándula adrenal, la placenta y el Sistema Nervioso Central (SNC). La  $P_4$  participa en procesos como la regulación de la ovulación, el mantenimiento del embarazo, la conducta sexual, la excitabilidad neuronal, la neuroprotección, la memoria y el aprendizaje, el sueño y el desarrollo de tumores cerebrales (Grumberg et al., 1991; Camacho-Arroyo, 2003). El  $E_2$  está involucrado en la diferenciación sexual del cerebro, en la conducta sexual femenina, en la maduración ósea, crecimiento y desarrollo de la glándula mamaria (Hall et al., 2001).

Las hormonas esteroides una vez que son secretadas en el ovario, la glándula adrenal, la placenta o el SNC pasan al flujo sanguíneo donde pueden circular libres o unidas a proteínas plasmáticas, tales como la albúmina con un enlace inespecífico y poco afín, o a las globulinas, con una unión de gran especificidad y de gran afinidad (Wilson y Foster, 1992).

Los efectos de las hormonas esteroideas ocurren a corto, mediano y largo plazo debido a que éstas tienen diversos mecanismos de acción (Camacho-Arroyo et al., 1995). La  $P_4$  y el  $E_2$  ejercen sus efectos a través de mecanismos genómicos y no genómicos. El mecanismo genómico involucra la unión de la  $P_4$  y el  $E_2$  con sus receptores intracelulares para regular la transcripción de genes específicos. El mecanismo no genómico involucra la acción de la  $P_4$  y el  $E_2$  sobre la membrana plasmática, sistemas de segundos mensajeros, interacción con receptores membranales específicos, canales iónicos, activación de cascadas de fosforilación e interacción con receptores de neurotransmisores como el del ácido  $\gamma$ -aminobutírico subtipo A ( $GABA_A$ ) (Prieto et al., 2003).

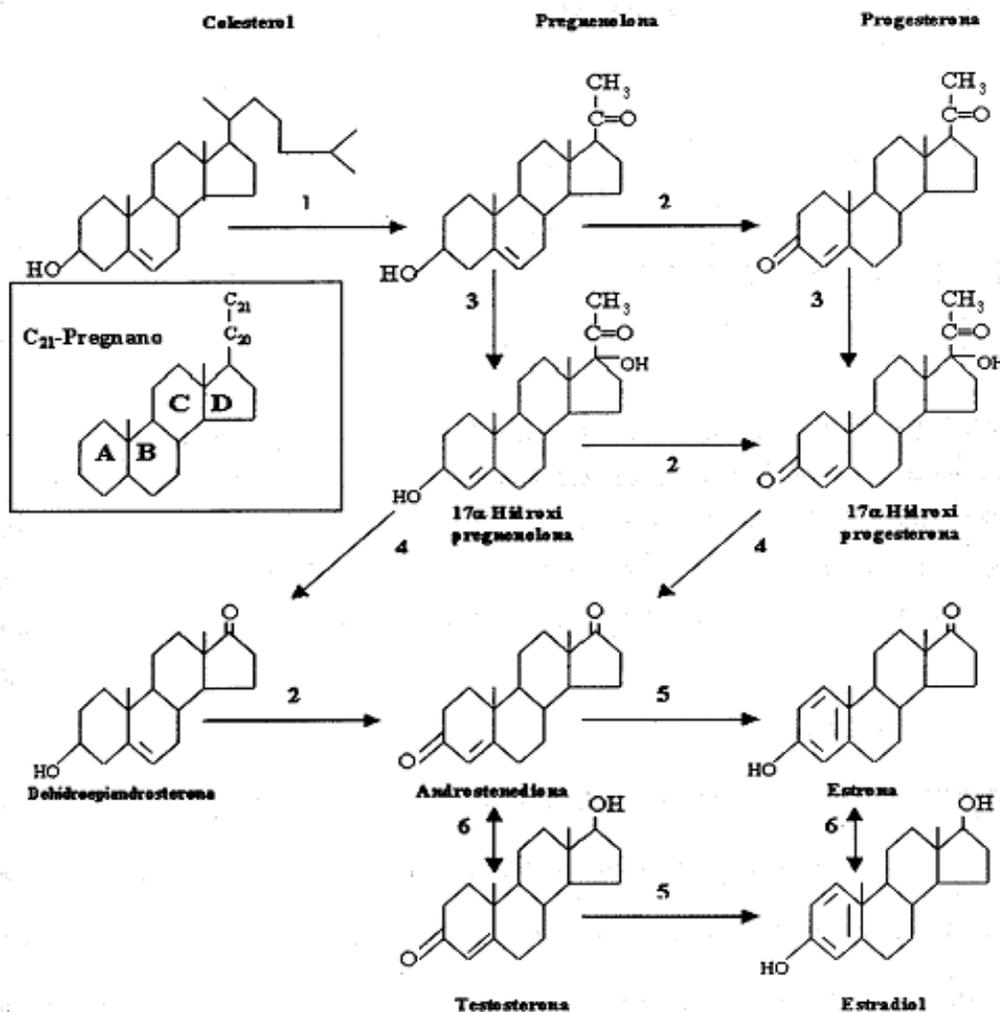


Figura 1. Síntesis de las principales hormonas esteroideas. 1) 20,22 desmolasa; 2) 3 $\beta$ -OH-esteroide deshidrogenasa; 3) 17 $\alpha$ -hidrolasa; 4) 17,20-esteroide liasa; 5) aromatasa; 6) 17 $\beta$ -OH-esteroide deshidrogenas (Gore-Langton, 1988).

## 4.2 Receptores a hormonas esteroides

Los receptores a  $P_4$  y  $E_2$  pertenecen a la familia de receptores nucleares, estas proteínas actúan como factores de transcripción activados por su ligando que regulan específicamente la expresión de genes blanco involucrados en el metabolismo, desarrollo y reproducción (Tsai y O'Malley, 1994). Se han identificado tres tipos de receptores nucleares: 1) los receptores de tipo I (clásicos o esteroides) incluyen a los de  $P_4$  (RP), estrógenos (RE), andrógenos (RA), glucocorticoides (RG) y mineralocorticoides (RM), los receptores en ausencia de ligando se encuentran unidos a proteínas de choque térmico (HSP) y en este estado no inducen la transcripción de genes; 2) los receptores de tipo II incluyen al receptor a hormonas tiroideas (RT), a los del ácido retinoico (RAR y RXR) y al de la vitamina  $D_3$  (RVD), estos receptores son capaces de unirse al DNA en ausencia de ligando y pueden ejercer un efecto de represión en sus promotores denominado silenciamiento; 3) los receptores huérfanos son aquellos que aún no se han identificado sus ligandos endógenos (McKenna et al., 1999).

Los receptores de tipo I contienen seis dominios. En el extremo N-terminal se encuentra el dominio A/B, que es la de mayor variabilidad entre los receptores y además tiene la función de activación 1 (AF-1), que es una de las regiones con actividad transcripcional del receptor. El dominio C es el que se une al DNA (DBD), 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 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 correguladores. Además el dominio E tiene una señal de localización nuclear y la función de activación 2 (AF-2) involucrada en la regulación de la transcripción (Tata, 2002; Camacho-Arroyo y Rodríguez-Dorantes, 2006). El dominio F participa en la función transcripcional del receptor y en su unión con agonistas y antagonistas (Figura 2) (Schwartz et al., 2002).

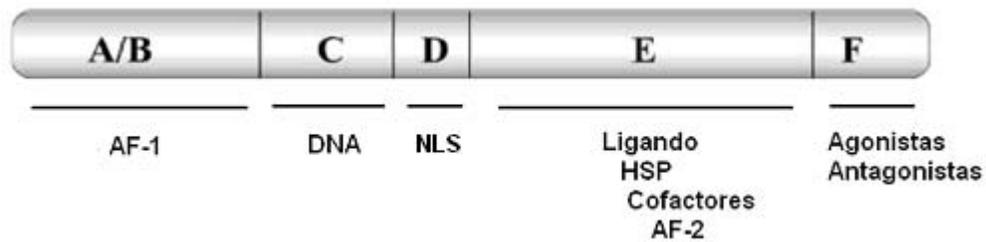


Figura 2. Representación de los 6 dominios funcionales de los receptores a hormonas esteroides. Función de activación 1 y 2 (AF-1 y AF-2), señal de localización nuclear (NLS), proteínas de choque térmico (HSP).

Las hormonas esteroides atraviesan las membranas celulares por difusión simple y en el núcleo o en el citoplasma se unen a sus respectivos receptores, la unión provoca un cambio estructural en el receptor que le permite la disociación de las proteínas de choque térmico (HSP70, HSP90 y HSP56), lo que exponen la región que le permite fosforilarse y dimerizarse, resultando en una estructura con alta afinidad a secuencias específicas en el DNA llamadas elementos de respuesta hormonal (HRE). Una vez unido al HRE, el complejo ligando-receptor facilita el ensamblaje y la estabilización del complejo de pre-iniciación de la transcripción en los promotores de genes regulados por hormonas esteroides (figura 3) (Camacho-Arroyo y Rodríguez-Dorantes, 2006).

El receptor activado unido al ligando puede reclutar correguladores, como por ejemplo a coactivadores de receptores a hormonas esteroides (SRC) por medio del dominio E de manera dependiente de ligando. Los SRCs estabilizan el complejo de transcripción y también favorecen la modificación local de la estructura de la cromatina, lo que facilita la movilización de la RNA polimerasa II hacia la secuencia promotora (McKenna et al., 1999).

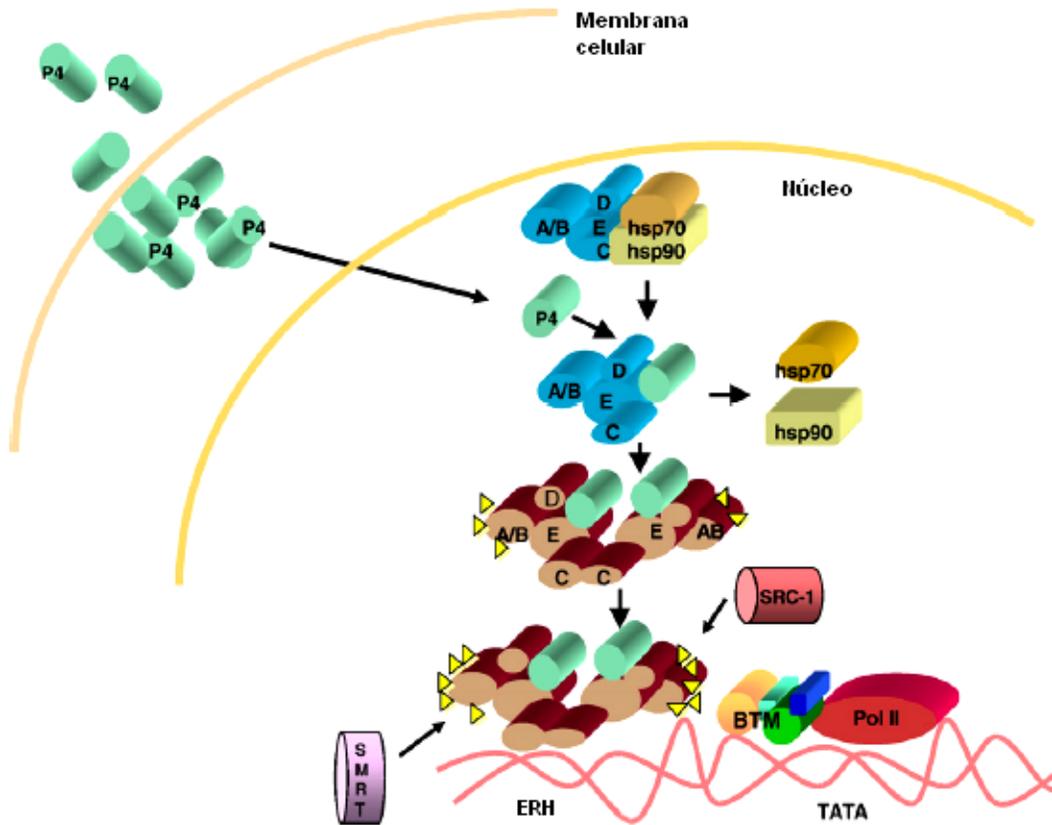


Figura 3. Mecanismo de acción genómico de las hormonas esteroides. El receptor a hormonas esteroides (dominios A/B, C, D, E) se encuentra en un estado de inactivación, unido a proteínas de choque térmico (HSP). La hormona (por ejemplo la progesterona;  $P_4$ ) atraviesa la membrana plasmática y la envoltura nuclear e interactúa con su receptor, se liberan las HSP, el receptor se dimeriza, se une a elementos de respuesta hormonal (ERH) y recluta a correguladores y a la maquinaria de transcripción basal (Camacho-Arroyo y Rodríguez-Dorantes, 2006).

### 4.3 Correguladores

Para ejercer sus efectos transcripcionales los receptores nucleares requieren de la interacción con otras proteínas denominadas correguladores (coactivadores y correpresores). Se ha reportado que los correguladores intervienen en la unión de los receptores con la maquinaria de transcripción basal y modifican la estructura de la cromatina regulando así la actividad transcripcional (Figura 4). Así, la activación y la represión son esenciales para la correcta función de los receptores. Los coactivadores son proteínas que interactúan con los receptores nucleares de manera ligando dependiente y aumentan la actividad transcripcional. Los correpresores son proteínas que se asocian con receptores nucleares en ausencia de hormona o en presencia de antagonistas, y reprimen la actividad transcripcional (Collingwood et al., 1999).

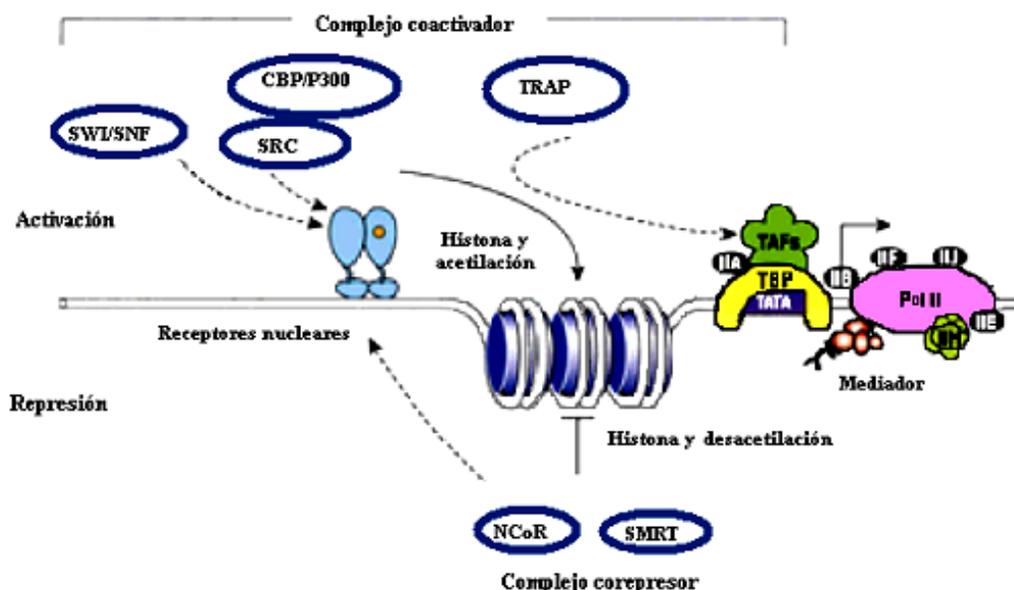


Figura 4. Regulación de la función de los receptores nucleares por múltiples complejos coactivadores y correpresores. Los correguladores modulan la interacción entre los receptores nucleares y la maquinaria de transcripción basal (TAFs, TBP, IIA IIB, IIF IIIH, IIE y Pol II) y remodelan la estructura de la cromatina. Proteína de unión a CREB (CBP), proteína de 300 kDa (p300), proteína de activación del receptor de hormonas tiroideas (TRAP), producto de los genes *swi/snf* (SWI/SNF), correpresor de receptores nucleares (NcoR), silenciador mediador para el receptor a hormonas tiroideas y ácido retinoico (SMRT) (Xu et al., 1999).

Cambios en el nivel y patrón de expresión de correguladores o mutaciones de sus dominios funcionales pueden influir en la expresión de genes blanco y así participar en el desarrollo de diversas enfermedades de una manera importante (Kumar et al., 2005).

#### 4.3.1 *Coactivadores*

Los coactivadores representan un grupo diverso de proteínas que desempeñan sus funciones a través de interacciones proteína-proteína, los coactivadores se unen a los receptores nucleares para potenciar su efecto en la transcripción de genes blanco, los coactivadores también pueden ser reclutados por la interacción con miembros de la familia de SRC (tabla 1) (Rowan et al., 2000).

Los coactivadores se asocian con los receptores nucleares de manera dependiente de ligando. Usualmente interaccionan con la parte C-terminal de los receptores nucleares, a través de los dominios LXXLL (L es leucina y X cualquier aminoácido) presentes en los coactivadores, la unión también puede ocurrir en el N-terminal del receptor en AF-1, la cual representa una forma alternativa de interacción (Heery et al., 1997).

Se han identificado varios coactivadores como: SRC-1, SRC-2, SRC-3, la proteína de 300 kDa (p300), proteína de unión a CREB (CBP), la proteína de interacción con el receptor (RIP), la proteína asociada al RE (ERAP) entre otras (Burris, 2001). Algunos coactivadores tienen actividades enzimáticas como los SRCs, p300/CBP y factor asociado-p300/CBP (pCAF) que poseen actividad de histona acetiltransferasa (HAT), mientras que otros coactivadores pueden tener actividad de histona metiltransferasa por ejemplo la proteína arginina metiltransferasa 1 (PRMT1) y el coactivador asociado a arginina metiltransferasa 1 (CARM1), otros coactivadores tienen actividad de ubiquitina ligasa como la proteína asociada a E6 (E6-AP), el factor potenciador del receptor 1 (RPF1) y la enzima conjugadora de ubiquitina 7 (UbcH7) o de actividad de ATPasa como el complejo SWI/SNF y gen relacionado a Brahma 1 (BRG1). La actividad de HAT modifica la estructura de la cromatina, neutralizando la carga positiva de las histonas, interrumpiendo

las interacciones iónicas entre las histonas cargadas positivamente y el esqueleto del DNA cargado negativamente (McKenna et al., 1999; Lonard y O'Malley, 2005).

Tabla 1. Coactivadores de los receptores a hormonas esteroides.

Coactivador	Nombre alternativo	Correguladores relacionados estructuralmente	Función
SRC-1	hSRC-1 NcoA-1 p160	SRC-2 y SRC-3	Posee actividad de HAT y estabiliza el complejo de preiniciación de la transcripción.
SRC-2	GRIP-1/mSRC-2 NcoA-2, p160, TIF2	SRC-1 y SRC-3	Posee actividad de HAT y estabiliza el complejo de preiniciación de la transcripción.
SRC-3	ACTR/hSRC-3, p/CIP/mSRC-3, RAC3/hSRC-3, AIB-1/hSRC, TRAM-1/hSRC-3	SRC-1 y SRC-2	Posee actividad de HAT y estabiliza el complejo de preiniciación de la transcripción.
p300		CBP	Posee actividad de HAT. Interacciona con PCAF, CARM1 y SRCs.
CBP		p300	Posee actividad de HAT. Interacciona con SRCs.
E6-AP		RPF-1 (hRSp5)	Es una ubiquitina ligasa, involucrada en la degradación de proteínas.
pCAF	hGCN5		Posee actividad de HAT. Interacciona con SRCs.
BRG-1	Brahma	SWI/SNF	Remodelación de la cromatina.
SRA			Funciona como transcritto de RNA.
CARM1			Posee actividad de histona metiltransferasa. Interacciona con SRCs.
PRMT1			Posee actividad de histona metiltransferasa.

#### 4.3.2 Coactivadores de receptores a hormonas esteroides (SRC)

Los dominios funcionales de la familia de SRC son: el dominio básico hélice-asa-hélice (bHLH), el dominio Per/ARNT/Sim (PAS: Per, proteína período involucrada en el ciclo circadiano de *Drosophila*; ARNT, translocador del receptor nuclear de aril hidrocarburo; Sim, proteína única de *Drosophila*) localizado en la región amino terminal inicialmente identificado en *Drosophila*, está involucrado en homodimerización y la heterodimerización con proteínas que contienen estos dominios, éste es el dominio más conservado entre los 3 miembros de la familia SRC (Huang et al., 1993). La región central contiene 3 motivos LXXLL, responsables de la interacción con los receptores nucleares (Chen et al., 2000). Existen dos dominios de activación (AD1 y AD2), en donde, AD1 es responsable de la interacción con otros coactivadores como CBP y p300, sin embargo no interacciona con los receptores nucleares, la región AD2 se localiza en la parte carboxilo terminal y es responsable de la actividad de HAT, (Figura 5) (Xu y Li, 2003).

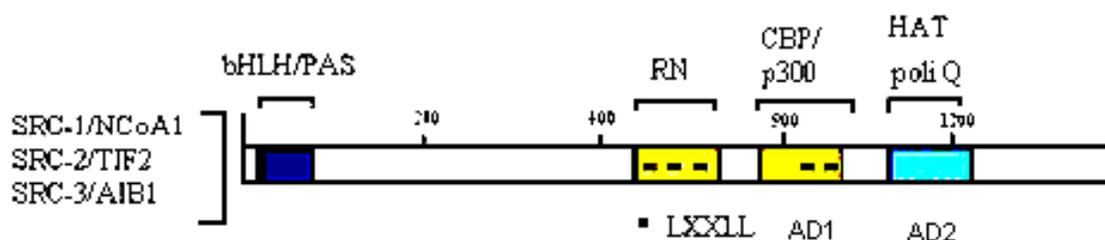


Figura 5. Estructura y dominios funcionales de los SRC. Dominio hélice-asa-hélice Per/ARNT/Sim (bHLH/PAS); motivos LXXLL (donde L es leucina, X es cualquier otro aminoácido); receptor nuclear (RN); regiones ricas en glutamina (poli Q); actividad de histona acetiltransferasa (HAT); dominio de activación (AD 1 y 2) (Xu y Li, 2003).

La familia de los SRC consiste de tres miembros homólogos que son: SRC-1, SRC-2 y SRC-3. Los tres coactivadores presentan un peso molecular de aproximadamente 160 kDa y tienen un 40% de similitud en la secuencia completa (Huang et al., 1993), y en pruebas de transfección *in vitro* se ha demostrado que pueden aumentar la actividad de algunos receptores nucleares de forma similar, lo que puede sugerir una redundancia funcional entre

los miembros de la familia de SRC (McKenna et al., 1999), sin embargo, existe evidencia de que poseen diferentes funciones.

SRC-1 fue el primer coactivador para receptores a esteroides clonado y caracterizado (Oñate et al., 1995). Exhibe un amplio rango de variabilidad en la coactivación de la transactivación de receptores nucleares, incluyendo RP, RG, RE, RA, RT y RXR. En ratones “knockout” para SRC-1 se ha observado una resistencia parcial a hormonas esteroides y una disminución en el crecimiento del útero y glándula mamaria (Xu et al., 1998). SRC-1 se ha localizado en el pulmón, la hipófisis, el útero, la placenta, la glándula mamaria, los testículos y sistema nervioso (Chen et al., 1997; Xu et al., 1998). En el sistema nervioso, SRC-1 es altamente expresado en el hipotálamo, hipocampo, cerebelo, tálamo y amígdala (Meijer et al., 2000). En el sistema nervioso SRC-1 puede participar en la señalización del RE, implicado en la desfeminización del cerebro de ratas macho (Molenda et al., 2002).

Se ha demostrado que la falta de SRC-1 retrasa el desarrollo y maduración de células de Purkinje en el cerebelo de ratón, resultando en una disfunción motora (Nishihara et al., 2003). Por otro lado, SRC-1 es requerido en el desarrollo neuronal normal en ratones (Nishihara et al., 2004). Existe evidencia de que SRC-1 está involucrado en la progresión del cáncer de próstata, por ejemplo, Fujimoto et al., (2001) encontraron que la expresión de SRC-1 es más alta en grados avanzados de cáncer de próstata o en cánceres con una baja respuesta a terapias hormonales. Por otro lado se ha demostrado una alta expresión de SRC-1 y del RA en cánceres de próstata recurrentes (Gregory et al., 2001).

SRC-2 está involucrado en el metabolismo de lípidos, balance energético, y parece ser esencial para la adhesión de células de Sertoli a células germinales. Ratones machos y hembras que carecen de SRC-2 muestran alteraciones en la fertilidad (Zhang et al., 2004). SRC-2 también es altamente expresado en cánceres de próstata recurrentes (Fujimoto et al., 2001). SRC-2 se asocia al RP, RE, RA y RAR (McKenna et al., 1999). En el cerebro se expresa menos que SRC-1 y está presente predominantemente en la hipófisis anterior (Meijer et al., 2000).

SRC-3 es el más diferente de los tres miembros de la familia de SRC, ya que coactiva a varios receptores nucleares como RP, RE, RG y RT, pero también a otros factores de transcripción, como los que son activados por AMPc y citocinas. SRC-3, es expresado en pulmón, hipófisis, útero, placenta, glándula mamaria, testículos y en cerebro principalmente en hipocampo y bulbo olfatorio (Chen et al., 1997; Xu et al., 1998). En ratones “knockout” para SRC-3 se ha observado que este corregulador es requerido para el crecimiento normal y funciones reproductivas (Xu et al., 2000).

SRC-3 es frecuentemente sobreexpresado y algunas veces amplificado en células cancerosas y en tumores primarios de cáncer de mama, ovario (Anzick et al., 1997), carcinoma endometrial (Glaeser et al., 2001), cáncer gástrico (Sakakura et al., 2000) y cáncer de próstata (Gnanapragasam et al., 2001). La amplificación del gen de SRC-3, también se ha correlacionado con la expresión de RE y RP que presentan los tumores primarios de mama, así como, con el tamaño del tumor (Bautista et al., 1998), estas observaciones sugieren un papel de SRC-3 como oncogen.

Por otro lado, se conoce que la sobreexpresión ya sea de SRC-1, SRC-2 o SRC-3 puede aumentar la sobrevivencia celular cuando hay exposición a algún agente citotóxico (TNF- $\alpha$ ) e inducir la proliferación celular, por lo que se sugiere que estos coactivadores pueden ser blancos terapéuticos en el tratamiento del cáncer (Weldon et al., 2004).

Experimentos de inmunolocalización revelan una distribución intracelular célula-específica de SRC-1, SRC-2 y SRC-3, la cual puede depender de la duración de la inducción hormonal, por ejemplo, en astrocitos de rata tratados con glucocorticoides, SRC-1 y SRC-2 fueron localizados principalmente en núcleo, mientras que SRC-3 se encontró en el Aparato de Golgi. En células de Schwann, SRC-1 se localizó en núcleo o citoplasma dependiendo de la estimulación hormonal. Por otro lado, SRC-2 se encontró estrictamente en núcleo y SRC-3 predominantemente en citoplasma (Grenier et al., 2006).

Los SRC son afectados por modificaciones postraduccionales como son la fosforilación, acetilación, sumoilación y ubiquitinación. La fosforilación provoca la activación de las proteínas y produce un cambio conformacional en distintos sitios de los SRCs. SRC-1 presenta siete sitios de fosforilación, mientras que SRC-3 presenta 6. Los sitios de fosforilación identificados en los SRCs son blanco de las vías de señalización mediadas por cinasas, incluyendo la vía de MAPK, la vía de AMPc/PKA y la vía de NF- $\kappa$ B. Estas vías de señalización inducen activación y reclutamiento diferencial de los SRCs, por ejemplo, la vía de MAPK activada por EGF fosforila a SRC-1 en la Ser-1179 y 1185, promoviendo así la capacidad de coactivación de SRC-1 en la transcripción de genes dependientes de RP (Li y Shang 2007).

Por otro lado, estudios *in vitro* e *in vivo* sobre la degradación de los SRCs por ubiquitinación, demuestran que en presencia de un inhibidor del proteosoma, aumenta el contenido a nivel proteína de SRC-1, SRC-2 y SRC-3, además de presentar una alta actividad transcripcional (Li y Shang 2007). Estudios en nuestro laboratorio han demostrado que el contenido de SRC-1 aumenta en el hipotálamo y en el área preóptica de ratas tratadas con el inhibidor del proteosoma MG132 (Villamar-Cruz et al., 2006). La sumoilación no promueve la degradación de los SRCs, pero modifica sus propiedades funcionales y su localización subcelular. En la sumoilación la proteína denominada modificador semejante a ubiquitina pequeño 1 (SUMO-1) se une covalentemente a residuos de lisina causando un cambio conformacional en la proteína blanco, promoviendo o inhibiendo las interacciones proteína-proteína, por ejemplo, la sumoilación de SRC-1 en la Lys-732 y 774 incrementa la interacción con RP y una prolongada retención de SRC-1 en núcleo (Chauchereau et al., 2003). La acetilación de los SRCs parece tener un papel en la represión de la señalización de los coactivadores. La acetilación de SRC-3 promueve la neutralización de las cargas positivas existente en sus residuos, provocando la disociación del complejo coactivador-receptor. La metilación recientemente se ha encontrado involucrada en la represión transcripcional, a través de la modificación de los SRCs, ya que puede regular la estabilización de los coactivadores al aumentar su degradación y modificar sus interacciones con otros coactivadores. Estas modificaciones postraduccionales pueden inducirse por hormonas esteroideas (Li y Shang 2007).

Se sabe que SRC-1, SRC-2 y SRC-3 contribuyen a la regulación temporal de la transcripción de genes mediada por receptores nucleares, esto puede ser explicado en parte por la forma en que son reclutados, se conoce que SRC-3 dimeriza con SRC-1 o SRC-2 para ser reclutados en los promotores de genes que contienen un elemento de respuesta a hormona clásico (ERH). En contraste, en promotores de genes que no contienen un ERH clásico, en donde los receptores a hormonas esteroides se unen indirectamente, ya sea SRC-1 o SRC-2 son reclutados como monómeros. Típicamente, genes que no contienen un ERH son activados rápidamente por los receptores a hormonas esteroides, mientras que los genes que contienen un ERH son sólo activados por la estimulación prolongada con los ligandos (Zhang et al., 2004).

La expresión tejido-específica de los coactivadores contribuye a la función de los receptores nucleares, por ejemplo, las funciones del RP en distintos tejidos es modulada por diferentes coactivadores. En ratones se ha reportado que SRC-3 es el principal coactivador que modula la expresión de genes dependientes de RP durante el desarrollo de la glándula mamaria, mientras que SRC-1 modula la actividad del RP en el útero (Han et al., 2006). Por otro lado, en la línea celular derivada de endometrio (Ishikawa) la alta expresión de SRC-1 influye en la actividad ejercida por el tamoxifen, en este caso actúa como agonista al unirse al RE, mientras que en la línea celular de cáncer de mama MCF-7 la baja expresión de SRC-1 contribuye a que el tamoxifen actúe como antagonista (Shang y Brown, 2002)

Estudios en nuestro laboratorio han demostrado que el contenido de SRC-1 puede modificarse por variaciones hormonales por ejemplo: en el pulmón de la rata aumenta durante el diestro y disminuye en el proestro y estro (González-Arenas et al., 2004); mientras que en el hipotálamo disminuye durante el diestro, pero aumenta durante el proestro y estro (Camacho-Arroyo et al., 2005).

Se ha observado que el E<sub>2</sub> disminuye la expresión del RNAm de SRC-1 en la hipófisis de ratas macho adultas (Misiti et al., 1998). Por el contrario, la expresión del RNAm de

SRC-1 es inducida por la administración de E<sub>2</sub> por 3 días en el núcleo ventromedial hipotalámico de ratas ovariectomizadas (Mitev et al., 2003).

Se ha propuesto que la sobreexpresión de SRC-1 en células de cáncer de mama positivas al RE- $\alpha$  conlleva a un aumento en la expresión del factor derivado de células estromales 1 $\alpha$  (SDF-1 $\alpha$ ), lo cual puede inducir la invasión y metástasis de células de cáncer (MCF-7) que expresan altos niveles del receptor de SDF-1 $\alpha$  (CXCR4) y otros genes prometastásicos (Kishimoto et al., 2005).

#### **4.4 Expresión de correguladores en líneas celulares de cáncer**

En la línea celular MCF-7 se ha encontrado un alto nivel del RNAm de SRC-3 (Anzick et al., 1997), mientras que en línea celular de cáncer de mama T-47D se ha encontrado un bajo nivel de RNAm de SRC-3, asimismo en estas líneas celulares se ha observado la expresión del correpresor NcoR y los coactivadores pCAF y CBP. En MCF-7 y T47D se reporta una baja expresión de los coactivadores p300 y SRC-2 y del correpresor SMRT (Vienonen et al., 2003).

También se ha demostrado en la línea celular MCF-7 que la expresión a nivel de proteína de SRC-1 aumenta con el tratamiento de E<sub>2</sub> (durante 24 h), pero no con 4-hidroxitamoxifen, y además, se determinó que el RE- $\alpha$  y RE- $\beta$  preferentemente interactúan con SRC-1 en presencia de  $\beta$ -estradiol. Así mismo, la expresión a nivel de la proteína de SMRT aumentó en presencia de E<sub>2</sub> y 4-hidroxitamoxifen, y este último indujo la interacción de SMRT con el RE- $\alpha$  y RE- $\beta$  (Fleming et al., 2004).

Lauritsen et al., (2002) reportan que la expresión del RNAm de SRC-3 disminuye con E<sub>2</sub> en la línea celular MCF-7, observándose una reducción significativa después de las 4 h de iniciado el tratamiento y manteniéndose en esa condición por al menos 48 h, paralelamente se muestra una disminución a nivel de proteína de SRC-3 por E<sub>2</sub> en los mismos tiempos de estudio. Por otro lado, el tratamiento con antiestrógenos (ICI 182,780 y 4-hidroxitamoxifen) aumenta la expresión del RNAm de SRC-3. Contrariamente al reporte

anterior, Vienonen et al., (2003) encontraron que en la línea celular MCF-7 la expresión del corregulador SRC-3 no cambia con el tratamiento de E<sub>2</sub> durante 24 y 72 h.

#### **4.5 Astrocitomas**

Los astrocitomas son las neoplasias intracerebrales primarias más comunes en humanos (Poirier et al., 1990), constituyen el 45% de todos los tumores del Sistema Nervioso Central. Tienen una apariencia uniforme con alta actividad proliferativa de los astrocitos (Nguyen et al., 1984). Los astrocitomas más malignos presentan mayor delimitación, en tanto que los benignos son difusos e infiltrantes, con tendencia a formar cavidades largas. La presencia de un astrocitoma puede provocar varios síntomas como son: dolor de cabeza y déficits neurológicos dependiendo de la localización cerebral del tumor (Kleihues y Cavenee, 2000). De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud, los astrocitomas son clasificados de acuerdo a sus características histológicas (presencia de atipia, mitosis, proliferación endotelial y necrosis) en cuatro grupos:

- 1) Astrocitomas pilocíticos (grado I), se localizan comúnmente en el cerebelo, y el diencefalo especialmente en el hipotálamo. Histológicamente se observan áreas densas y difusas, astrocitos bipolares. Hay presencia de atipia nuclear, cambios vasculares limitados a proliferación capilar. Crecen despacio y difícilmente se diseminan a los tejidos circundantes, se presentan con mayor regularidad en niños y adultos jóvenes (5 a 15 años) y hay la posibilidad de curación posterior a la resección quirúrgica.
- 2) Astrocitomas difusos (grado II), se localizan en hemisferios cerebrales, se presentan células pleomórficas y multinucleadas, además de proliferación vascular. Crecen lentamente pero generalmente se diseminan al tejido circundante, algunos de éstos evolucionan a un grado superior, se presentan generalmente en adultos jóvenes de entre 30 y 40 años.
- 3) Astrocitomas anaplásicos (grado III), se encuentran principalmente en los hemisferios cerebrales y tallo cerebral, presentan un aumento celular, pleomorfismo, actividad mitótica, y atipia nuclear. Crecen rápidamente y se diseminan a los tejidos circundantes, se presenta en adultos de 40 a 60 años, este es el grado de astrocitoma

más común y pueden tener una transición rápida a otro grado de evolución en un corto tiempo.

- 4) Glioblastomas (grado IV), se localizan en hemisferios cerebrales y ocasionalmente en tallo cerebral, cerebelo y médula. Las células muestran una gran heterogeneidad en cuanto a forma, hay degeneración, necrosis y hemorragia. Son astrocitomas malignos que crecen y diseminan de forma acelerada, se presentan generalmente en adultos entre las edades de 45 a 70 años (Daumas-Duport et al., 1988; Batistatou et al., 2004).

A nivel de población, la frecuencia de padecer un astrocitoma es mayor en hombres (2:1), sin embargo, se ha reportado que las mujeres presentan una mayor progresión tumoral de un astrocitoma grado I, II y III hacia uno de grado IV (Ohgaki y Kleihues 2007).

Ciertos tumores cerebrales expresan receptores a hormonas esteroides, por ejemplo, se ha detectado la expresión del gen del RP en tumores astrocíticos. Esto sugiere que las hormonas esteroides pueden estar involucradas en el desarrollo de gliomas, como evidencia se ha reportado un aumento en el tamaño del tumor en mujeres embarazadas, el cual disminuye después del parto. Por otro lado, Khalid et al., (1997) encontraron en muestras de pacientes con astrocitomas de diferentes grado de evolución tumoral que la expresión del RP es mayor en astrocitoma grado IV. Además, estudios en nuestro laboratorio han demostrado la presencia de las isoformas A y B del RP en astrocitomas de grado III y IV, siendo la isoforma B la predominante. La expresión diferencial de las isoformas del RP es importante porque la P<sub>4</sub> puede ejercer una función diferente en una célula dependiendo de la expresión de las isoformas del RP (González-Agüero et al., 2001).

Asimismo, estudios en nuestro laboratorio han demostrado que la P<sub>4</sub> induce la proliferación en dos líneas celulares de astrocitomas humano U373 y D54 (grados III y IV respectivamente), la cual es bloqueada por RU486 (antagonista de RP), sugiriendo que el efecto de P<sub>4</sub> es mediada por RP el cual es expresado en estas células (González-Agüero et al., 2007).

En general, se ha reportado que el RE $\alpha$  no es expresado en tumores astrocíticos y que el RE $\beta$  es altamente expresado en astrocitos normales y en astrocitomas de bajo grado de evolución, y conforme aumenta el grado del tumor la expresión del RE $\beta$  disminuye (Carroll et al., 1995; y González-Agüero et al., 2001). Datos de nuestro laboratorio han mostrado que el RE $\alpha$  y RE $\beta$  son expresados en las líneas celulares de astrocitomas humano U373 y D54, y que el contenido del RE $\beta$  aumenta significativamente con E<sub>2</sub> en las dos líneas celulares (Cabrera-Muñoz et al., 2007 enviado).

Por otro lado se sabe que los coactivadores se unen a los receptores de hormonas esteroides para potenciar su efecto en la transcripción de sus genes blanco y se ha sugerido que cambios en la expresión de los coactivadores puede contribuir a la carcinogénesis o a la respuesta hormonal de tumores (Vienonen et al., 2003), sin embargo, se desconoce la expresión de los coactivadores SRC-1 y SRC-3 en líneas celulares de astrocitomas humanos y por consiguiente su regulación por P<sub>4</sub> y E<sub>2</sub>.

## **V. OBJETIVOS**

El objetivo general de este trabajo fue determinar la expresión de SRC-1 y SRC-3 en las líneas celulares de astrocitomas humanos U373 y D54 y su regulación por P<sub>4</sub> y E<sub>2</sub>.

En tanto los objetivos particulares fueron los siguientes:

1. Cuantificar la expresión de SRC-1 y SRC-3 a nivel del mRNA y de la proteína en las líneas celulares de astrocitomas humanos U373 y D54 y su regulación por P<sub>4</sub> y E<sub>2</sub>.
2. Comparar la regulación de la expresión de los correguladores en la línea celular U373 y D54.

## **VI. HIPÓTESIS**

La expresión de los correguladores SRC-1 y SRC-3 estará regulada por  $P_4$  y  $E_2$  en las líneas celulares de astrocitomas humanos U373 y D54.

## **VII. METODOLOGÍA**

### **7.1 Cultivo celular**

Las líneas celulares de astrocitoma humano U373 y D54 (grado III y IV de evolución tumoral) fueron cultivadas en medio DMEM con rojo fenol adicionado con suero fetal bovino (SFB) al 10% hasta obtener el 80% de confluencia celular. Una vez obtenida la confluencia se contó el número de células en un hemocitómetro (cámara de Neubauer) y se colocaron 2, 000,000 de células en cajas petri de 10 cm con medio DMEM con rojo fenol adicionado con SFB durante 24 h, posteriormente se les cambió el medio por DMEM sin rojo fenol adicionado con SFB libre de hormonas durante 24 h. Las células recibieron posteriormente los tratamientos de vehículo (V, ciclodextrina 30 nM en agua estéril), 17- $\beta$  estradiol (10 nM) acoplado a ciclodextrina y P<sub>4</sub> (10 nM) acoplada a ciclodextrina. Las dosis usadas modifican la proliferación de estas líneas celulares, así, como la expresión del RP y el RE (González-Agüero et al., 2007) y se formaron los siguientes grupos:

- 1) V, durante 12 h , 24 h y 48 h
- 2) E<sub>2</sub>, durante 12 h, 24 h y 48 h
- 3) P<sub>4</sub>, durante 12 h, 24 h y 48 h.

Las células fueron colectadas por medio de lavados con PBS en frío (4°C) a las 12 h, 24 h y 48 h después de iniciados los tratamientos. La suspensión de células se centrifugó a 2000 rpm durante 5 min, se decantó el sobrenadante y el botón celular obtenido se destinó para extraer proteínas o RNA.

### **7.2 Extracción de proteínas**

Las células se colocaron en buffer de lisis TDG (tris-ditiotreitol-glicerol) con inhibidores de proteinasas (Tris-HCl 10 mM, ditiotreitol 1 mM, glicerol al 30%, tritón al 1%, azida de sodio 15 mM, EDTA 1 mM, leupeptina 4  $\mu$ g/ml, aprotinina 22  $\mu$ g/ml, PMSF 1 mM, ortovanadato de sodio 1 mM) a 4°C.

Las muestras fueron centrifugadas a 12,500 rpm, durante 45 min, a 4°C y separando el sobrenadante. La concentración de proteínas en el sobrenadante se determinó por el método de Bradford (Bradford, 1976), utilizando albúmina sérica bovina como estándar para la curva patrón.

### **7.3 Western Blot**

Cada muestra de proteína obtenida de las células (tomando un volumen correspondiente a 100 µg) se mezcló con Buffer de carga (Tris 0.5 M pH 6.8, glicerol 10%, SDS 2%, β-mercapto-etanol 5%) en una proporción de 1:1 y se hirvieron durante 5 min para depositarse en geles de poliacrilamida. Las proteínas se separaron por electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida al 6% a 60 volts hasta que las muestras pasaran el gel concentrador y después a 80 volts para el gel de corrida durante 2 horas.

Las proteínas fueron transferidas a una membrana de polivinilideno (Millipore) a 211 mA, durante 1 h 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 PBS-tween (PBS pH=7.4 + Tween al 0.05%).

Las membranas fueron incubadas durante toda la noche a 4°C con los siguientes anticuerpos: anti-SRC-1 (anticuerpo monoclonal de ratón, Upstate 05-522) o anti-SRC-3 (mezcla de anticuerpo policlonal de cabra Santa Cruz sc-7216 y anticuerpo monoclonal de ratón sc-5305) en una dilución 1:250. Las membranas fueron lavadas con PBS-Tween 3 veces por 5 minutos y posteriormente incubadas con el anticuerpo secundario anti-ratón o anti-cabra (IgG-HRP) conjugado a peroxidasa en dilución 1:5000 durante 1 h (Santa Cruz sc-2033 y sc-2005). Se utilizó un método de detección 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 al reaccionar generan una señal de quimioluminiscencia al exponer las membranas a placas radiográficas.

Para corregir las posibles diferencias en la cantidad de proteína total cargada en cada pozo, se incubaron con un anticuerpo primario anti- $\alpha$ -tubulina en una concentración de 1:10,000 (Sigma) durante toda la noche a 4°C, las membranas fueron lavadas con PBS-Tween 3 veces por 5 minutos; después se incubaron 1 hora con un anticuerpo secundario anti-ratón acoplado a peroxidasa en una concentración de 1:15,000 (Santa Cruz sc-2033) y posteriormente se utilizó el método de detección de alta sensibilidad descrito anteriormente.

Cada placa fue sometida a un análisis densitométrico con el programa ChemiImager 4400, para cuantificar la expresión de SRC-1, SRC-3 y  $\alpha$ -tubulina de acuerdo a la intensidad de cada banda. Para cada experimento los datos obtenidos de SRC-1 y SRC-3 se normalizaron con los de  $\alpha$ -tubulina.

#### **7.4 Extracción de RNA total**

A las células D54 y U373 recolectadas se les agregó 1 ml de trizol (Invitrogen) a 4°C, se homogenizaron en el vortex, se les agregó 200  $\mu$ l de cloroformo, se agitaron y se mantuvieron en hielo durante 5 min. Al final se obtuvieron dos fases: la inferior de color rojo compuesta por fenol:cloroformo y la porción superior incolora, el RNA quedó en esta última fase, mientras que el DNA y las proteínas se mantuvieron en una interfase y en la fase orgánica, respectivamente.

Para la precipitación del RNA, se transfirió la fase incolora a un tubo eppendorf, se agregó un volumen equivalente al extraído de isopropanol y se mantuvieron las muestras a 4°C toda la noche. Posteriormente se centrifugaron las muestras a 12000 rpm durante 15 min a 4°C. El RNA se observó en una pastilla de color blanca amarillenta. Después, se retiró el sobrenadante de las muestras, se realizó un lavado con etanol al 75% (1 ml) y se agitaron en el vortex durante 30 s. Se centrifugaron las muestras a 7500 rpm durante 8 min a 4°C, se realizó otro lavado con etanol al 80% y se centrifugaron las muestras a 7500 rpm durante 8 min a 4°C, se eliminó el sobrenadante y se secó la pastilla formada de cada muestra. La cantidad de RNA extraído se cuantificó en el espectrofotómetro a 260 y 280

nm. Para conocer las condiciones del RNA extraído, éste se analizó en geles de agarosa al 1% en condiciones desnaturalizantes (con formaldehído 37%). Se utilizaron las muestras en las que el RNA estuviera íntegro, determinado por la observación clara de las bandas correspondientes a los RNAs ribosomales 28S y 18S, además, de que no se encontrara el RNA degradado ni la presencia de DNA.

### **7.5 Oligonucleótidos para RT-PCR.**

Se diseñaron oligonucleótidos para amplificar por RT-PCR fragmentos de los genes de SRC-1 y SRC-3. Se obtuvieron las secuencias publicadas en el GenBank para cada gen y posteriormente analizadas por el programa PRIMER3, las secuencias resultantes se muestran a continuación:

#### **SRC-1**

Región del N-terminal. Nucleótido 1015 al 1334.

Sentido 5'– CCTCCAGCTATTACGGGTGTAG– 3'

Antisentido 5'– ATGATGAAAGGTTGCATGTCTG– 3'

Temperatura de alineamiento: 55°C

Longitud del oligonucleótido: 22 pb

Tamaño del producto: 320 pb

#### **SRC-3**

Región del N-terminal. Nucleótidos 2103 al 2440.

Sentido 5'– GTCATTCCTCCTTGACCAACTC – 3'

Antisentido 5'– ATCCCTGTCCAGCAGGTATCTA– 3'

Temperatura de alineamiento: 62.°C

Longitud del oligonucleótido: 22 pb

Tamaño del producto: 338 pb

## 7.6 RT-PCR

### 7.6.1 Síntesis de cDNA

Se agregaron los siguientes componentes en un tubo eppendorf (una reacción): 1  $\mu$ l de oligo (dT)<sub>12-18</sub> (500  $\mu$ g/ml, Invitrogen), 2  $\mu$ g de RNA total, 1  $\mu$ l dATP, 1  $\mu$ l dCTP, 1  $\mu$ l dGTP, 1  $\mu$ l dTTP y H<sub>2</sub>O destilada y estéril (el volumen necesario para tener un total de 12  $\mu$ l). La mezcla se calentó a 65°C durante 5 min, y posteriormente la muestra se mantuvo en hielo.

Después se añadieron 4  $\mu$ l de buffer para la primera hebra 5X (Invitrogen), 2  $\mu$ l de DTT 0.1 M (Invitrogen), 1  $\mu$ l de RNasa OUT (Invitrogen) mezclándolos suavemente y se incubó a 42°C durante 2 min. Transcurrido este tiempo se añadió 1  $\mu$ l (200 unidades) de la SuperScript II RT (Invitrogen) y se incubó la muestra a 42°C durante 50 min, para inactivar la reacción se calentó a 70°C durante 15 min.

### 7.6.2 PCR

Para determinar el número de ciclos necesarios para realizar las amplificaciones, se hizo una curva de éstos partiendo de 20, 25, 30, 35 y 40 ciclos. Para definir la temperatura de alineamiento de los oligonucleótidos, se realizó una curva de temperaturas de 56, 58, 60, y 62°C.

Las condiciones de PCR utilizadas fueron las siguientes:

10X Buffer de PCR II (200 mM Tris-HCL pH 8.4, 500 mM KCL)	2.5 $\mu$ l
25 mM MgCl <sub>2</sub>	1.2 $\mu$ l
10 mM dATP	1 $\mu$ l
10 mM dCTP	1 $\mu$ l
10 mM dTTP	1 $\mu$ l
10 mM dGTP	1 $\mu$ l
Oligonucleótido sentido (10 $\mu$ M)	0.85 $\mu$ l
Oligonucleótido antisentido (10 $\mu$ M)	0.85 $\mu$ l
Taq DNA polimerasa (5U/ $\mu$ l)	0.5 $\mu$ l
Molde (cDNA del RT)	2 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O destilada y estéril	13.1 $\mu$ l
	25 $\mu$ l volumen total

Se calentó la reacción a 94°C durante 5 min para desnaturalizar y se realizaron 25 ciclos para 18S, 28 ciclos para SRC-1 y 30 ciclos para SRC-3 de las siguientes condiciones: 94°C 1 min; 55°C para SRC-1, 60°C para 18S y 62°C para SRC-3 durante 1 min; 72°C 1min y para la etapa de extensión final se realizó a 72°C durante 5 min. En los experimentos se incluyeron los siguientes controles negativos: sin muestra de RNA (en la síntesis de cDNA) y otro sin cDNA (en el PCR).

Los productos de amplificación se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 2% y se observaron en un transiluminador de rayos UV. La intensidad de las bandas fue cuantificada mediante un análisis densitométrico.

## 7.7 Análisis estadístico

A los datos obtenidos se les realizó la prueba estadística de Mann-Whitney U. Se utilizó el programa SPSS 13.0 para calcular los valores de probabilidad.

## VIII. RESULTADOS

### 8.1 Expresión del RNAm de SRC-1 y SRC-3 en las líneas celulares de astrocitomas humano U373 y D54

En el presente estudio se cuantificó mediante la técnica de RT-PCR la expresión a nivel del RNAm de SRC-1 y SRC-3 en las líneas celulares de astrocitoma humano U373 y D54 tratadas con V (ciclodextrina 30nM), E<sub>2</sub> (10 nM) y P<sub>4</sub> (10 nM) durante 12 h y 24 h.

En la línea celular U373 (grado III) se observó que la expresión del RNAm de SRC-1 y de SRC-3 no presentó cambios significativos con el tratamiento de E<sub>2</sub> o P<sub>4</sub> comparado con V ni a las 12 h ni a las 24 h (Figura 6 y 7, respectivamente).

En la línea celular D54 (grado IV) el tratamiento con E<sub>2</sub> no modificó la expresión del RNAm de SRC-1 y de SRC-3. Sin embargo, el tratamiento con P<sub>4</sub> durante 12 h aumentó significativamente ( $P < 0.05$ ) la expresión del RNAm de SRC-1 (Figura 8); a las 24 h no se observó un cambio significativo en el RNAm de SRC-1 (Figura 9).

A)

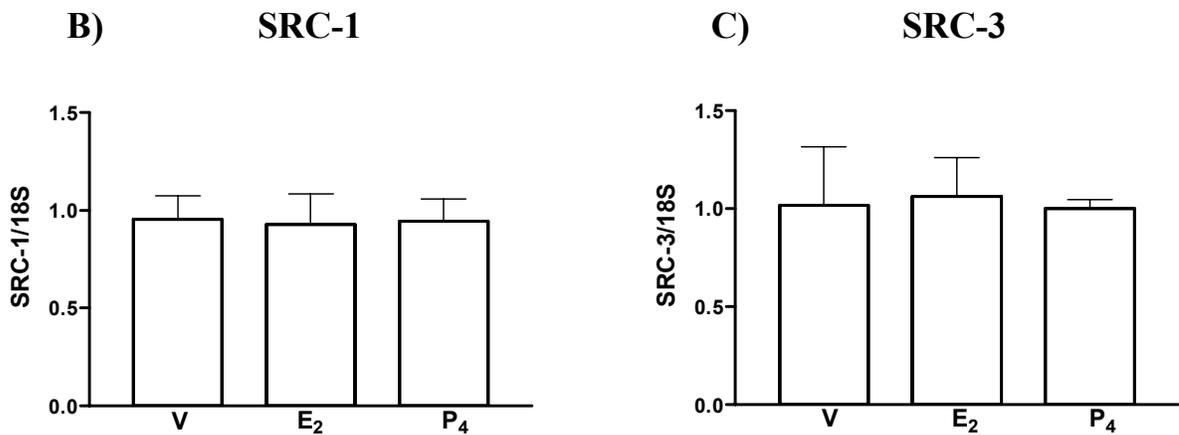
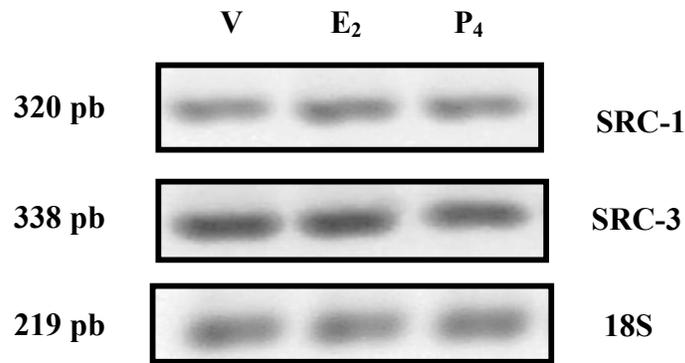
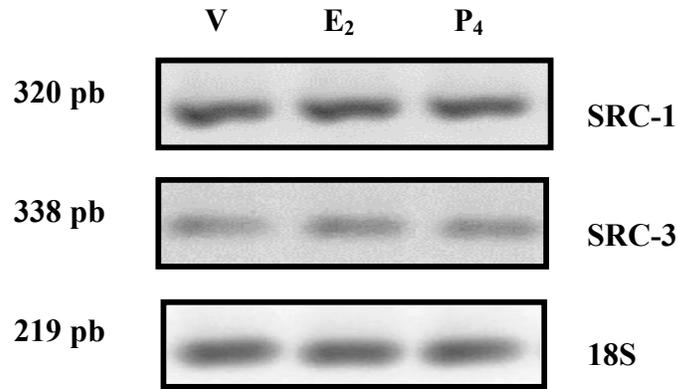


Figura 6. Expresión del RNAm de SRC-1 y SRC-3 en la línea celular U373 a las 12 h. A) Análisis del RNAm de los coactivadores por medio de RT-PCR, imagen representativa de tres experimentos independientes. Los experimentos se llevaron a cabo utilizando oligonucleótidos específicos para la amplificación de SRC-1, SRC-3 y 18S. Los productos de PCR se analizaron en geles de agarosa al 2% y se observaron en un transiluminador de rayos UV. El RNA ribosomal 18S se utilizó para normalizar los niveles de expresión de los coactivadores. B) Análisis densitométrico de SRC-1. C) Análisis densitométrico de SRC-3. Los resultados son expresados como media  $\pm$  S.E.M.

A)



U373 24 h

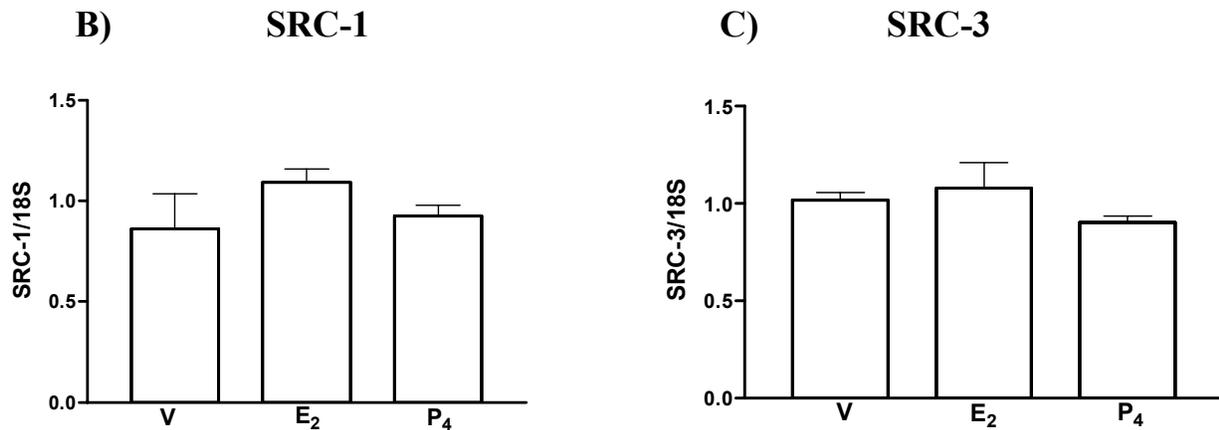
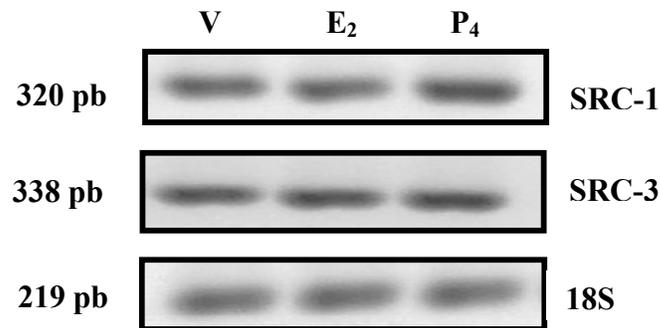


Figura 7. Expresión del RNAm de SRC-1 y SRC-3 en la línea celular U373 a las 24 h. A) Análisis del RNAm de los coactivadores por medio de RT-PCR, imagen representativa de tres experimentos independientes. El RNA ribosomal 18S se utilizó para normalizar los niveles de expresión de los coactivadores. B) Análisis densitométrico de SRC-1. C) Análisis densitométrico de SRC-3. Los resultados son expresados como media  $\pm$  S.E.M.

A)



D54 12 h

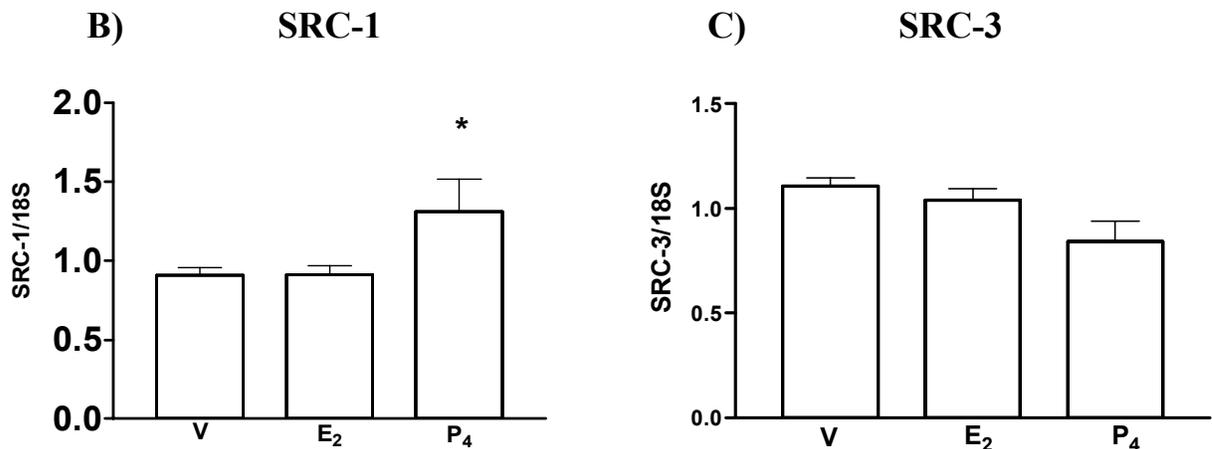
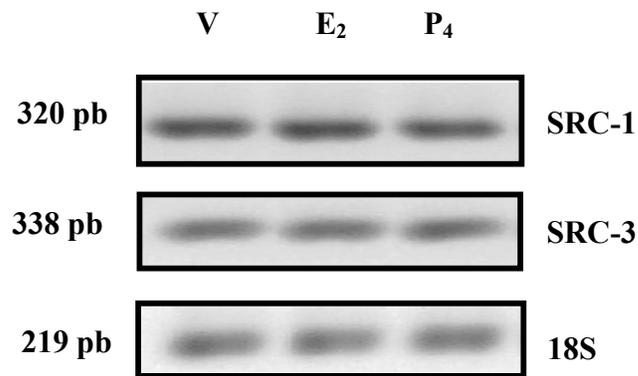


Figura 8. Expresión del RNAm de SRC-1 y SRC-3 en la línea celular D54 a las 12 h. A) Análisis del RNAm de los coactivadores por medio de RT-PCR, imagen representativa de cuatro experimentos independientes. El RNA ribosomal 18S se utilizó para normalizar los niveles de expresión de los coactivadores. B) Análisis densitométrico de SRC-1. C) Análisis densitométrico de SRC-3. Los resultados son expresados como media  $\pm$  S.E.M, \*  $P < 0.05$  comparado con V y E<sub>2</sub>.

A)



D54 24 h

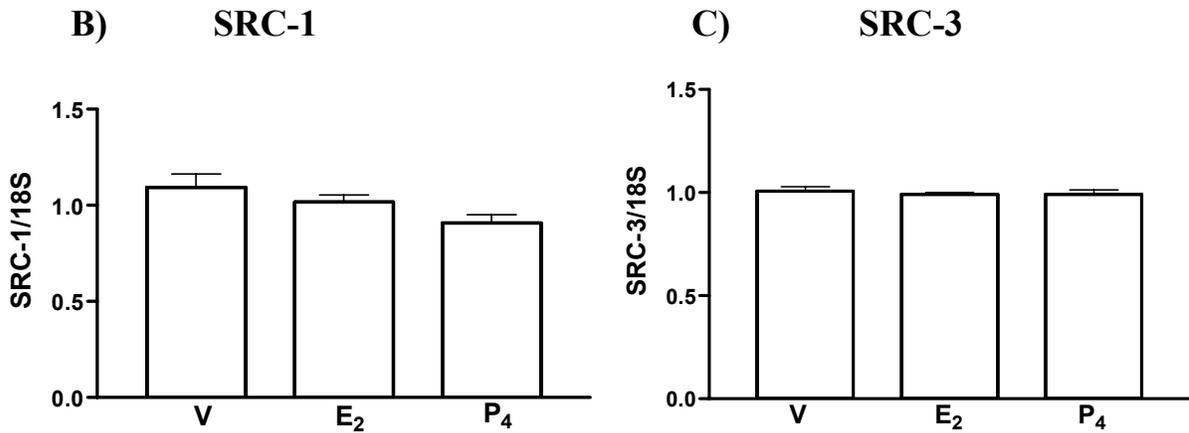


Figura 9. Expresión del RNAm de SRC-1 y SRC-3 en la línea celular D54 a las 24 h. A) Análisis del RNAm de los coactivadores por medio de RT-PCR, imagen representativa de cuatro experimentos independientes. El RNA ribosomal 18S se utilizó para normalizar los niveles de expresión de los coactivadores. B) Análisis densitométrico de SRC-1. C) Análisis densitométrico de SRC-3. Los resultados son expresados como media  $\pm$  S.E.M.

## **8.2 Contenido de la proteína de SRC-1 y SRC-3 en las líneas celulares de astrocitomas humano U373 y D54**

El contenido de SRC-1 y SRC-3 en las líneas celulares U373 y D54 y su regulación por E<sub>2</sub> y P<sub>4</sub> fue examinado mediante Western blot.

En la línea celular U373 al igual que en el caso del RNAm no se observaron diferencias significativas en el contenido de las proteínas de SRC-1 o de SRC-3 con ningún tratamiento hormonal a las 24 h o 48 h (Figuras 10 y 11).

En la línea celular D54 el E<sub>2</sub> no modificó el contenido de la proteína de SRC-1, mientras que la P<sub>4</sub> aumentó significativamente ( $P < 0.05$ ) el contenido de este coactivador a las 24 h (Figura 12A y B). De manera interesante el contenido de SRC-1 disminuyó significativamente ( $P < 0.05$ ) 48 h después de la administración de P<sub>4</sub> (Figura 12C y D). El contenido de SRC-3 no se modificó con ninguno de los tratamientos (Figura 13).

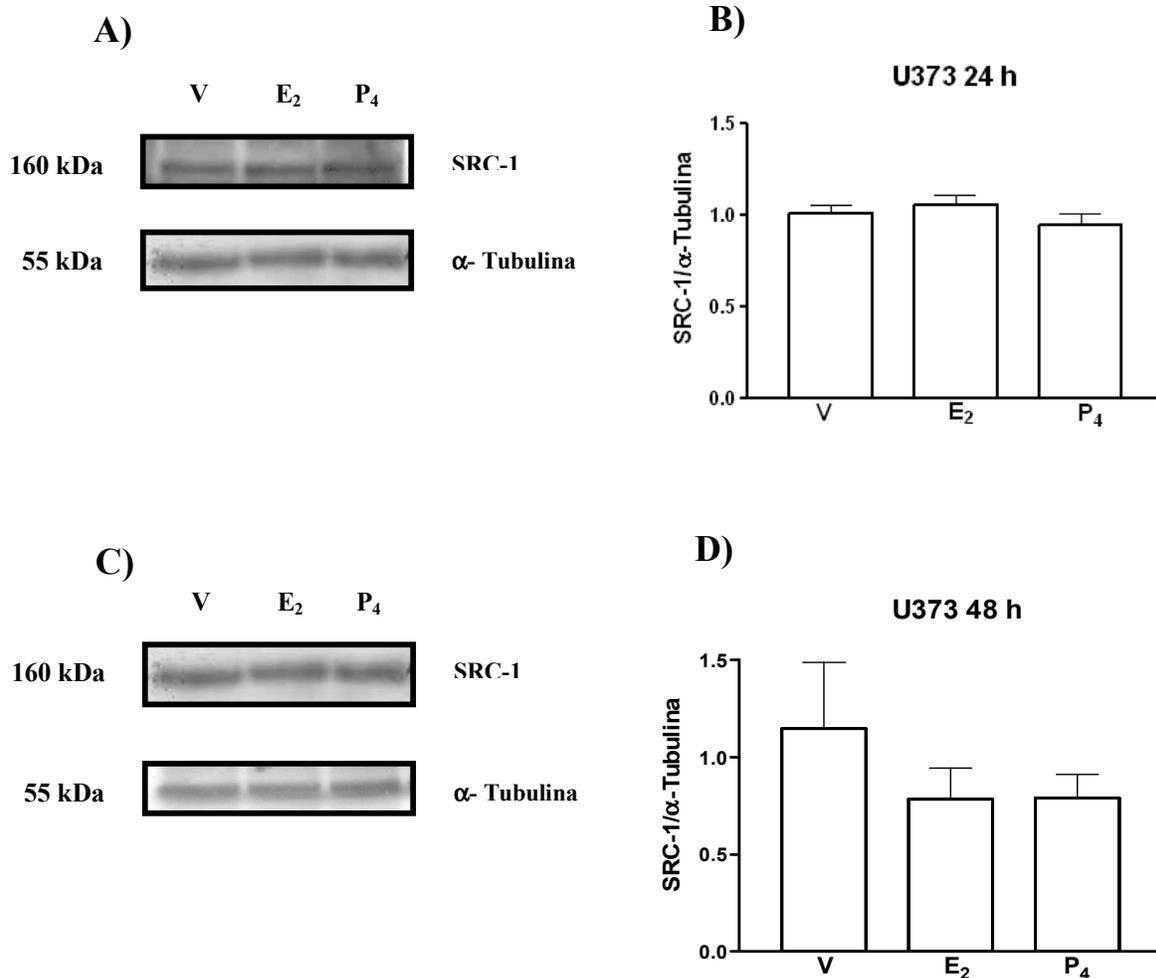


Figura 10. Contenido de la proteína de SRC-1 en línea celular U373. A) Western blot de SRC-1 a las 24 h, imagen representativa de tres experimentos. Las proteínas fueron separadas por electroforesis en SDS-PAGE al 6%. Las proteínas fueron transferidas en membranas e incubadas con anticuerpo anti-SRC-1 o  $\alpha$ -tubulina. El complejo proteína-anticuerpo fue detectado por quimioluminiscencia (ECL). B) Análisis densitométrico de SRC-1 a las 24 h, los datos fueron normalizados usando los de  $\alpha$ -tubulina. C) Western blot de SRC-1 a las 48 h, imagen representativa de tres experimentos. D) Análisis densitométrico de SRC-1 a las 48 h. Los resultados son expresados como media  $\pm$  S.E.M.

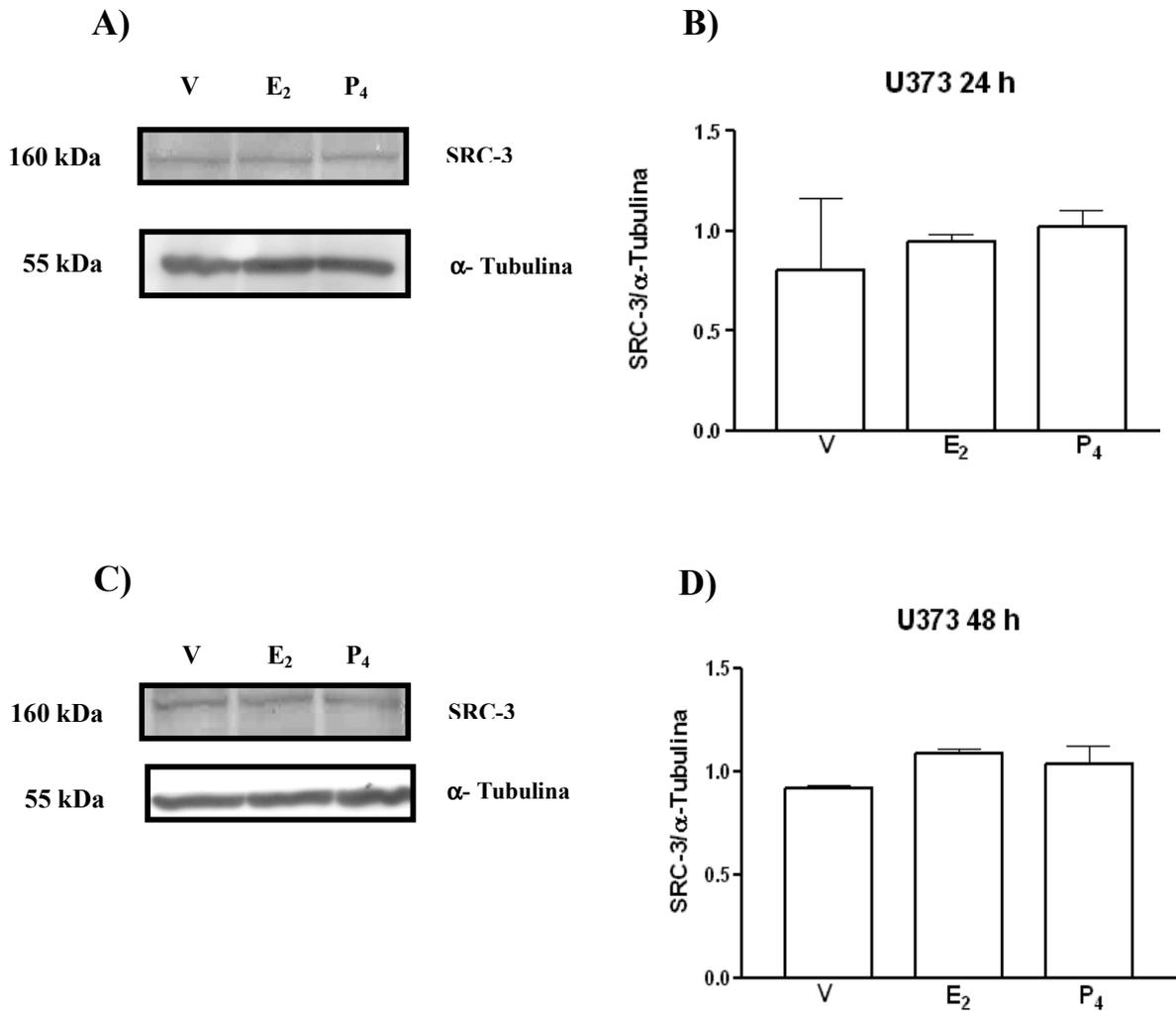


Figura 11. Contenido de la proteína de SRC-3 en línea celular U373. A) Western blot de SRC-3 a las 24 h, imagen representativa de tres experimentos. B) Análisis densitométrico de SRC-3 a las 24 h, los datos fueron normalizados usando los de  $\alpha$ -tubulina. C) Western blot de SRC-3 a las 48 h, imagen representativa de tres experimentos. D) Análisis densitométrico de SRC-3 a las 48 h. Los resultados son expresados como media  $\pm$  S.E.M.

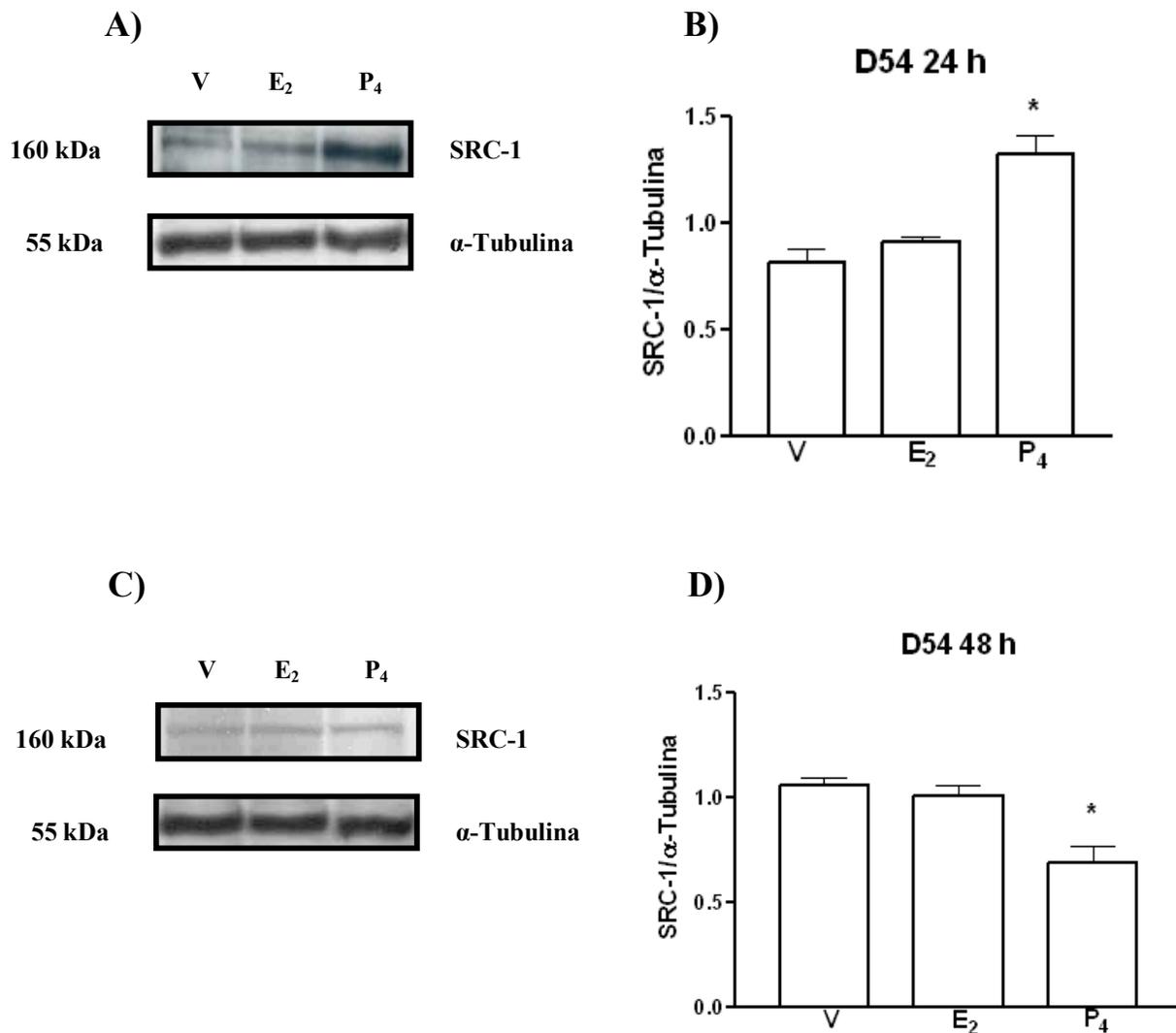


Figura 12. Contenido de la proteína de SRC-1 en línea celular D54. A) Western blot de SRC-1 a las 24 h, imagen representativa de cuatro experimentos. B) Análisis densitométrico de SRC-1 a las 24 h, los datos fueron normalizados usando los de  $\alpha$ -tubulina. C) Western blot de SRC-1 a las 48 h, imagen representativa de cuatro experimentos. D) Análisis densitométrico de SRC-1 a las 48 h. Los resultados son expresados como media  $\pm$  S.E.M, \*  $P < 0.05$  comparado con V y E<sub>2</sub>.

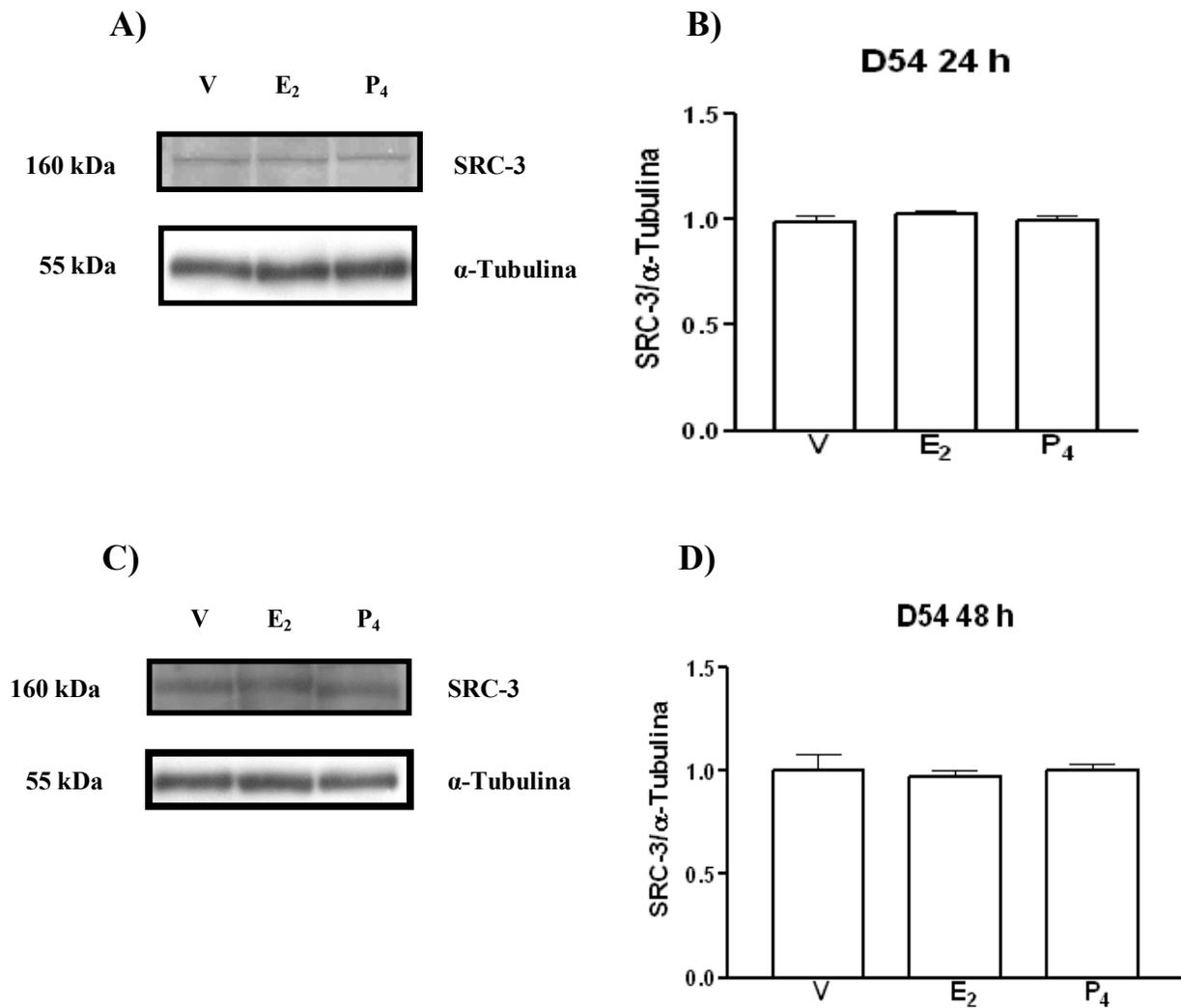


Figura 13. Contenido de la proteína de SRC-3 en línea celular D54. A) Western blot de SRC-3 a las 24 h, imagen representativa de cuatro experimentos. B) Análisis densitométrico de SRC-3 a las 24 h, los datos fueron normalizados usando los de  $\alpha$ -tubulina. C) Western blot de SRC-3 a las 48 h, imagen representativa de cuatro experimentos. D) Análisis densitométrico de SRC-3 a las 48 h. Los resultados son expresados como media  $\pm$  S.E.M.

## IX. DISCUSIÓN

Las hormonas esteroides, a través de la interacción con sus receptores nucleares, activan o reprimen la transcripción de varios genes blanco involucrados en diferentes funciones. Para ejercer sus efectos transcripcionales los receptores nucleares requieren de la interacción con otras proteínas denominadas correguladores (coactivadores y correpresores), los cuales intervienen en la interacción de los receptores con la maquinaria de transcripción basal y remodelan la estructura de la cromatina. Los coactivadores son proteínas que aumentan la actividad transcripcional de los receptores nucleares, mientras que, los correpresores son proteínas que la reprimen (Collingwood et al., 1999, Xu et al., 1999).

Se ha sugerido que la alteración en la expresión de coactivadores es un factor de riesgo para el desarrollo del cáncer, por ejemplo, la sobreexpresión de SRC-3 en ratones transgénicos provoca el desarrollo de tumores mamarios malignos (Torres-Arzayus et al. 2004). En la línea celular de cáncer de mama MCF-7 se ha encontrado que la expresión de SRC-1 está relacionada con la expresión de genes prometastásicos, ya que su sobreexpresión provoca un aumento en la expresión del factor derivado de células estromales relacionado con invasión y metástasis de células cancerosas (Kishimoto et al., 2005).

Así, cambios en los niveles de expresión del RE, RP y correguladores pueden influir en procesos transcripcionales y tener un papel en el desarrollo y progresión del cáncer, por lo que el estudio de su regulación es importante para dilucidar su papel en estos eventos. En las líneas celulares de astrocitomas humano U373 y D54, la expresión de SRC-1 y SRC-3 y su regulación por E<sub>2</sub> y P<sub>4</sub> se desconoce, por lo que, en el presente trabajo se evaluó el efecto del E<sub>2</sub> y la P<sub>4</sub> sobre la expresión de SRC-1 y SRC-3 en estas líneas celulares.

Los resultados obtenidos en la línea celular U373 mostraron que ni el E<sub>2</sub> ni la P<sub>4</sub> ejercieron un efecto sobre la expresión del RNAm de SRC-1 y SRC-3 a las 12 y 24 h de estudio. De forma similar, en la línea celular D54 ni el E<sub>2</sub> ni la P<sub>4</sub> causaron un cambio significativo en el RNAm de SRC-3. Existen reportes contradictorios en diferentes líneas

celulares de cáncer con respecto a la regulación de la expresión de SRC-1 y SRC-3 por E<sub>2</sub> y P<sub>4</sub>. Por ejemplo, en células de cáncer endometrial humano tratadas con E<sub>2</sub> durante 24 h no se detectaron diferencias significativas en los niveles del RNAm de SRC-1, (Thenot et al., 1999). Así mismo, Vienonen et al., (2003) reportaron que la expresión de RNAm de SRC-1 y SRC-3 no presentó cambios con el tratamiento de 17β-estradiol ni con la progestina R5020 (24 h o una semana) en las líneas celulares de cáncer de mama MCF-7 y T-47D. Por otro lado, se ha mostrado que el RNAm de SRC-1 disminuyó en células de hipófisis de rata GH3 después de recibir tratamiento con E<sub>2</sub> (Misiti et al., 1998). En la línea celular MCF-7 el 17β-estradiol aumentó la expresión del RNAm de SRC-3 después de 4 h de iniciado el tratamiento (Lauritsen et al., 2002). Estos datos pueden sugerir que la regulación de la expresión de SRC-1 y SRC-3 por E<sub>2</sub> y P<sub>4</sub> es célula-específica y que posiblemente esta regulación dependa del tiempo de estimulación hormonal. Aunque no se observaron cambios en la expresión de SRC-1 y SRC-3 en línea celular U373 y de SRC-3 en la línea celular D54 a las 12 y 24 h, no se descarta un efecto de las hormonas a otros tiempos de estudio en éstas líneas celulares, dadas las evidencias antes mencionadas.

En la línea celular D54 se observó que aumenta significativamente la expresión del RNAm de SRC-1 después de 12 h de tratamiento con P<sub>4</sub> (10 nM), mientras que, a las 24 h no se encontró dicho efecto. Se ha determinado que los efectos de la P<sub>4</sub> ocurren a corto, mediano y largo plazo debido a diferentes mecanismos de acción (genómico y no genómico). El mecanismo de acción genómico involucra la unión de la P<sub>4</sub> con el RP para regular la transcripción de genes específicos (Camacho-Arroyo y Rodríguez-Dorantes, 2006). Por otro lado, se conoce que el RP es regulado de manera negativa por P<sub>4</sub> en diferentes tejidos blanco (Camacho-Arroyo et al., 1996). Se sabe que la P<sub>4</sub> induce la fosforilación del RP para que éste pueda ser funcional y lleve a cabo su efecto genómico, aunque también es una señal para que posteriormente el RP sea degradado por el proteosoma 26S (Lange et al., 1999). El mecanismo de acción por el cual la P<sub>4</sub> regula la expresión del RNAm de SRC-1 en la línea celular D54 no se conoce, sin embargo, la expresión de SRC-1 observada podría estar mediada por el RP (vía genómica) regulando su transcripción dependiendo del tiempo de estimulación hormonal, por otro lado, es probable que después de 24 h de tratamiento con P<sub>4</sub> exista una disminución en el contenido del RP

provocando un decremento en la transcripción de genes como SRC-1 en esta línea celular. Para determinar si la P<sub>4</sub> regula la expresión de SRC-1 por medio de su receptor se necesitaría realizar experimentos donde las células D54 recibieran tratamiento con un antagonista del RP (RU486) a diferentes tiempos.

En la línea celular U373 se demostró que el contenido de la proteína de SRC-1 y SRC-3 no cambió con el tratamiento de E<sub>2</sub> y P<sub>4</sub> durante 24 y 48 h, posiblemente, como reflejo del nulo cambio en la expresión del RNAm de SRC-1 y SRC-3 observada previamente en la misma línea celular, la cual no fue modificada por los tratamientos hormonales (12 y 24 h). Se sabe que el E<sub>2</sub> y la P<sub>4</sub> pueden regular el contenido de los coactivadores dependiendo del tipo celular y tiempo de tratamiento, por ejemplo, se ha reportado que el contenido de SRC-1 y SRC-3 no cambia después de 6 h de tratamiento con P<sub>4</sub> en el epitelio luminal y glandular en el útero de ratón, sin embargo, el tratamiento con P<sub>4</sub> durante 3 días disminuye el contenido de SRC-1 y SRC-3 (Han et al., 2005). Por otro lado, un aumento en el contenido de la proteína de SRC-1 fue detectado en células MCF-7 tratadas con E<sub>2</sub> durante 24 h (Fleming et al., 2004). Es posible que en la línea celular U373 el E<sub>2</sub> y P<sub>4</sub> no estén regulando el contenido de SRC-1 y SRC-3, sin embargo, algunos estudios muestran que la regulación de los coactivadores depende de la duración de los tratamientos, por lo que, la regulación del contenido de SRC-1 y SRC-3 por el E<sub>2</sub> y P<sub>4</sub> durante tiempos menores a 24 h o mayores de 48 h requerirá de investigaciones posteriores en la línea celular U373.

Los resultados obtenidos en la línea celular D54 determinan que el tratamiento con P<sub>4</sub> aumenta significativamente el contenido de la proteína de SRC-1 a las 24 h, en contraste con los datos anteriores, después de 48 h de tratamiento con P<sub>4</sub> el contenido de SRC-1 disminuyó. Han et al., (2005) reportaron que el tratamiento con P<sub>4</sub> durante 6 y 72 h regula positivamente el contenido de SRC-1 en el estroma y el miometrio en el útero de ratón, esto sugiere que la P<sub>4</sub> regula el contenido de SRC-1 de manera célula específica. El cambio en el contenido de SRC-1 observado a las 24 h puede ser explicado en parte por la regulación de la P<sub>4</sub> ejercida a nivel transcripcional, ya que, el RNAm de SRC-1 aumentó después de 12 h de tratamiento con P<sub>4</sub> en la misma línea celular, también, es posible que la P<sub>4</sub> efectúe una regulación a nivel de la proteína de SRC-1, puesto que, a las 48 h se encontró que la P<sub>4</sub>

tiene otro efecto sobre el contenido de SRC-1, el cual no refleja el nivel del RNAm de SRC-1 determinado a las 24 h en las células D54. Se conoce que las hormonas esteroides inducen modificaciones postraduccionales en los SRCs promoviendo la activación de la proteína, especificidad, estabilidad o degradación (Li y Shang 2007). La fosforilación de los SRCs promueve su activación y es inducida por diferentes estímulos incluyendo las hormonas esteroides, posteriormente, la fosforilación puede servir como señal para su ubiquitinación y degradación (Wu et al., 2005). Se ha reportado *in vitro* e *in vivo*, en nuestro laboratorio y en otros, que SRC-1 es degradado por la vía ubiquitina-proteosoma 26S (Lonard et al., 2004; Villamar-Cruz et al., 2006). La disminución observada en el contenido de SRC-1 después de 48 h de tratamiento con P<sub>4</sub> en la línea celular D54, posiblemente, involucró un proceso de degradación mediado por la hormona. La vía por la cual se induce la degradación de SRC-1 no se conoce en la línea celular D54, el tratamiento con un inhibidor del proteosoma (MG132), podría aportar evidencia sobre si la P<sub>4</sub> (después de 48 h de tratamiento) puede mediar la degradación de SRC-1 por medio del proteosoma 26S. Estos datos sugieren que la P<sub>4</sub> ejerce una regulación diferencial sobre la expresión de SRC-1, pero no en la de SRC-3, en la línea celular D54. Por otro lado, el E<sub>2</sub> no muestra un efecto sobre la expresión de los dos coactivadores en ninguna de las dos líneas celulares.

Se sabe que el E<sub>2</sub> y la P<sub>4</sub> regulan distintas funciones en condiciones normales como patológicas (Gao et al., 2002). Se ha sugerido que las hormonas esteroides pueden estar involucradas en el desarrollo de tumores astrocíticos, por ejemplo, Khalid et al., (1997) reportaron una correlación entre el aumento en la expresión del RP y el aumento en la actividad proliferativa de tumores astrocíticos. Estudios en nuestro laboratorio han demostrado que la P<sub>4</sub> aumenta la proliferación en las líneas celulares de astrocitomas humano U373 y D54, la cual es bloqueada por RU486, sugiriendo que el efecto de P<sub>4</sub> es mediado por RP. Además, se ha encontrado que el contenido de las dos isoformas del RP cambia dependiendo de la línea celular U373 o D54 (González Agüero et al., 2007). Se ha reportado que la expresión de REβ disminuye conforme aumenta el grado del tumor astrocítico (Carroll et al., 1995; y González Agüero et al., 2001). Estos datos sugieren que la P<sub>4</sub> puede regular funciones importantes en las líneas celulares U373 y D54. En el presente trabajo, se demostró que la P<sub>4</sub> regula la expresión del coactivador SRC-1 sólo en la

línea celular D54, posiblemente esto dependa de la expresión de las isoformas del RP en cada línea celular y de su activación transcripcional mediada por P<sub>4</sub>. Se conoce que los SRCs pueden interactuar con el RP para regular la expresión de sus genes blanco. La interacción entre los coactivadores y el RP es altamente regulada y es tejido-específica. Se ha demostrado que el RP recluta preferentemente a SRC-1 después de la administración de P<sub>4</sub> en la línea celular de cáncer de mama T47D (Li et al., 2003) y en el útero de ratón (Han et al., 2006), mostrando a su vez un aumento en la actividad transcripcional del RP. Esto puede sugerir que la regulación de la expresión de SRC-1 (y no la de SRC-3) por P<sub>4</sub> en la línea celular D54 este dada en parte porque SRC-1 sea requerido para modular la actividad transcripcional del RP dependiente de P<sub>4</sub>. Para confirmar lo anterior mencionado se necesitaría realizar experimentos que demuestren que SRC-1 es reclutado por RP al administrar P<sub>4</sub> y que esta interacción a su vez promueve la regulación de SRC-1 en la línea celular D54.

## **X. CONCLUSIONES**

La  $P_4$  regula la expresión de SRC-1, pero no la de SRC-3 en la línea celular de astrocitoma humano D54.

La expresión de SRC-1 y SRC-3 no es regulada por  $E_2$  en las líneas celulares de astrocitomas humanos U373 y D54, ni por  $P_4$  en la línea celular U373.

## **XI. REFERENCIAS**

- Anzick SL., Kononen J., Walker RL., Azorsa DO., Tanner MM., Guan XY., Sauter G., Kallioniemi OP., Trent JM., y Meltzer PS. 1997. AIB1, a steroid receptor coactivator amplified in breast and ovarian cancer. *Science*. 277:965-968.
- Bautista S., Valles H., Walker RL., Anzick S., Zeillinger R., Meltzer P., y Theillet C. 1998. In breast cancer, amplification of the steroid receptor coactivator gene AIB1 is correlated with estrogen and progesterone receptor positivity. *Clin. Cancer Res.* 4: 2925-2929.
- Batistatou A., Stefanou D., Goussia A., Arkoumani E., Papavassiliou AG., y Agnatis NJ. 2004. Estrogen receptor beta (ER-beta) is expressed in brain astrocytic tumors and declines with dedifferentiation of the neoplasm. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 130:405-410.
- Burris. 2001. The nuclear receptor superfamily in: T.P. Burris, E.R.B. McCabe (Eds.), *Nuclear Receptors and Genetic Disease*, Academic Press, New York. Pp. 1-57.
- Cabrera-Muñoz E., González-Arenas A., Saqui-Salces M., Rivas-Suárez M., y Camacho-Arroyo I. 2008. Regulation of progesterone and oestrogen receptor isoforms content by agonists and antagonists in human astrocytoma cell lines. *Journal of Neuroendocrinology*. Enviado.
- Camacho-Arroyo I., Pasapera A., Pérez-Palacios G., y Cerbón MA. 1995. Progesterone and its metabolites in central nervous system function. *Rev. Invest. Clin.* 47:329-340.
- Camacho-Arroyo I., Pasapera A., y Cerbón MA. 1996. Regulation progesterone receptor gene expression by sex steroid hormones in the hypothalamus and the cerebral cortex of the rabbit. *Neurosci. Lett.* 214:25-28.

- Camacho-Arroyo I. 2003. Progesterone receptor isoforms and progesterone actions in the brain. In Gayathri A (Ed) Recent Research Developments in Life Sciences. Research Signpost. Kerala. Pp.221-242
- Camacho-Arroyo I., Neri-Gómez T., González-Arenas A., y Guerra-Araiza C. 2005. Changes in the content of steroid receptor coactivator-1 and silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptors in the rat brain during the estrous cycle. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*. 94:267-272.
- Camacho-Arroyo I., y Rodríguez-Dorantes M. 2006. Transcriptional activity regulated by progesterone receptor isoforms. In: Research Signpost (Ed) *Molecular Endocrinology Kerala India*. Pp 25-38.
- Carroll RS., Zhang J., Dashner K., Sar M., y Black PM. 1995. Steroid hormone receptors in astrocytic neoplasms. *Neurosurgery*. 37:496-503.
- Collingwood TN., Urnov FD., y Wolffe AP. 1999. Nuclear receptors: coactivators, corepressors and chromatin remodeling in the control of transcription. *J. Mol. Endocrinol*. 23:255-275.
- Chauchereau A., Amazit L., Quesne M., Guiochon-Mantel A., y Milgrom E. 2003. Sumoylation of the progesterone receptor and of the steroid receptor coactivator SRC-1. *The Journal of Biological Chemistry*. 14:12335-12343.
- Chen H., Lin R.J., Schiltz RL., Chakravarti D., Nash A., y Nagy L. 1997. Nuclear receptor coactivator ACTR is a novel histone acetyltransferase and forms a multimeric activation complex with PCAF and CBPp300. *Cell*. 90:569-580.
- Chen D., Huang SM., y Stallcup MR. 2000. Synergistic, p160 coactivator-dependent enhancement of estrogen receptor function by CARM1 and p300. *Journal of Biological Chemistry*. 275:40810-40816.

Daumas-Duport C., Scheithauer B., O'Fallon J., y Kelly P. 1988. Grading of astrocytomas. *Cancer*. 62:2152-2165.

Fleming FJ., Hill A., McDermott E., O'Higgins N., y Young L. 2004. Differential recruitment of coregulator proteins steroid receptor coactivator-1 and silencing mediator for retinoid and thyroid receptors to the estrogen receptor-estrogen response element by  $\beta$ -estradiol and 4-hydroxytamoxifen in human breast cancer. *The Journal of clinical Endocrinology & Metabolism*. 89:375-383.

Fujimoto N., Mizokami A., Harada S., y Matsumoto T. 2001. Different expression of androgen receptor coactivators in human prostate. *Urology*. 58:289-294.

Gao X., Loggie BW., y Nawaz Z. 2002. The roles of sex steroid receptor coregulators in cancer. *Mol. Cancer*. 14:1-7.

Glaeser M., Floetotto T., Hanstein B., Beckmann M., y Niederacher D. 2001. Gene amplification and expression of the steroid receptor coactivator SRC-3 (AIB1) in sporadic breast and endometrial carcinomas. *Horm. Metab. Res*. 33:121-126.

Gnanapragasam VJ., Leung HY., Pulimood SA., Neal DE., y Robson CN. 2001. Expression of RAC3, a steroid hormone receptor coactivator in prostate cancer. *Br. J. Cancer*. 85:1928-1936.

González-Agüero G., Ondarza R., Gamboa-Domínguez A., Cerbón MA., y Camacho-Arroyo I. 2001. Progesterone receptor isoforms expression pattern in human astrocytomas. *Brain Res Bull*. 56:43-48.

González-Agüero G, Gutiérrez AA, González-Espinosa D, Solano DJ, Morales R, González-Arenas A, Cabrera-Muñoz E, y Camacho-Arroyo I. 2007. Progesterone

- effects on cell growth of U373 and D54 human astrocytoma cell lines. *Endocrine*. 32:129-135.
- González-Arenas A, Neri-Gómez T., Guerra-Araiza C., y Camacho-Arroyo. 2004. Sexual dimorphism in the content of progesterone and estrogen receptors, and their cofactors in the lung of adult rats. *Steroids*. 69:351-356.
- Gore-Langton R. 1998. Cyclosporine differentially affects estrogen and progestin synthesis by rat granulosa cells in vitro. *Mol Cell Endocrinol*. 57:187-198.
- Grenier J., Trousson A., Chauchereau A., Cartaud J., Schumacher M., y Massaad C. 2006. Differential recruitment of p160 coactivators by glucocorticoid receptor between Schwann cells and astrocytes. *Molecular Endocrinology*. 20:254-267.
- Gregory CW., He B., Johnson RT., Ford OH., Mohler JL., French FS., y Wilson EM. 2001. A mechanism for androgen receptor-mediated prostate cancer recurrence after androgen deprivation therapy. *Cancer Res*. 61:4315-4319.
- Grumberg SM., Weiss MH., Ahmadi J., Sadum A., Russell CA., Lucci L., y Stevenson LL. 1991. Treatment of unresectable meningiomas with the antiprogestin agent mifepristone. *J Neurosurg*. 74:861-866.
- Hall J., Couse J., y Korach K. 2001. The multifaceted mechanisms of estradiol and estrogen receptor signaling. *J. Biol. Chem*. 276:36869-36872.
- Han SJ, Jeong J, DeMayo FJ, Xu J, Tsai SY, Tsai M-J, y O'Malley, BW. 2005. Dynamic cell type specificity of SRC-1 coactivator in modulating uterine progesterone receptor function in mice. *Mol. Cell Biol*. 25:8150-8165.

- Han SJ., DeMayo FJ., Xu J., Tsai SY., Tsai M-J., y O'Malley BW. 2006. Steroid receptor coactivator (SRC-1) and (SRC-3) differentially modulate tissue-specific activation functions of the progesterone receptor. *Molecular Endocrinology*. 20:45-55.
- Hayashi Y., Ohmori S., Ito T., y Seo H. 1997. A splicing variant of Steroid Receptor Coactivator-1 (SRC-1E): the major isoform of SRC-1 to mediate thyroid hormone action. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 236:83-7.
- Heery DM., Kalkhoven S., Hoare S., y Parker A. 1997. A signature motif in transcriptional coactivators mediates binding to nuclear receptors. *Nature*. 387: 733-736.
- Huang ZJ., EderyI., y Rosbash. 1993. PAS is a dimerization domain common to *Drosophila* period and several transcription factors. *Nature*. 364:259-262.
- Iwasaki K, Toms SA, Barnett GH, Estes ML, Gupta MK y Barna BP. 1995. Inhibitory effects of tamoxifen and tumor necrosis factor alpha on human glioblastoma cells. *Cancer Immunol. Immunother.* 40:228-234.
- Khalid H., Shibata S., Kishikawa M., Yasunaga A., Iseki M., y Hiura T. 1997. Immunohistochemical analysis of progesterone receptor and Ki-67 labeling index in astrocytic. *Cancer*. 80:2133-2140.
- Kishimoto H., Wang Z., Bhat-Nakshatri P., Chang D., Clarke R., y Nakshatri H. 2005. The p160 family coactivators regulate breast cancer cell proliferation and invasion through autocrine/paracrine activity of SDF-1a/CXCL12. *Carcinogenesis*. 10:1706-1715.
- Kleihues P., y Cavenee WK. 2000. Pathology and genetics of tumors of the nervous system. World Health Organization Classification of tumors. Lyon, IARC Press.
- Knobil E., y Neil JD. 1988. Physiology of reproduction, follicular steroidogenesis and its control. Raven Press, Nueva York. Pp. 331-335.

- Kumar R., Gururaj A., Vadlamudi R., y Rayala S. 2005. The Clinical Relevance of Steroid Hormone Receptor Corepressors. *Clin. Cancer Res.* 11:2822-2830.
- Lange CA., Shen T., y Horwitz K. 2000. Phosphorylation of human progesterone receptors at serine-294 by mitogen-activated protein kinase signals their degradation by the 26S proteasome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97:1032-1037.
- Lauritsen KJ., List HJ., Reiter R., Wellstein A., y Riegel AT. 2002. A role for TGF- $\beta$  in estrogen and retinoid mediated regulation of the nuclear receptor coactivator AIB1 in MCF-7 breast cancer cells. *Oncogene.* 21:7147-7155.
- Lavinsky RM., Jepsen K., Heinzl T., Torchia J., Mullen T., Schiff R., DelRio A., Ricote M., Ngo S y Gemsch J. 1998. Diverse signaling pathways modulate nuclear receptor recruitment of N-CoR and SMRT complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95:2920-2925.
- Li X., Wong J., Tsai SY., Tsai MJ., y O'Malley BW. 2003. Progesterone and Glucocorticoid Receptors Recruit Distinct Coactivator Complexes and Promote Distinct Patterns of local chromatin modification. *Molecular and Cellular Biology.* 23:3763-3773.
- Li S., y Shang Y. 2007. Regulation of SRC family coactivators by post-translational modifications. *Cellular Signalling.* 1-12.
- Lonard DM., Tsai LS., y O'Malley BM. 2004. Selective estrogen receptor modulators 4-hydroxytamoxifen and raloxifen impact the stability and function of SRC-1 and SRC-3 coactivator proteins. *Molecular and Cellular Biology.* 24:14-24.
- Lonard DM, y O'Malley, BW. 2005. Expanding functional diversity of the coactivators. *TRENDS in Biochemical Sciences* 30:126-132.

- McKenna, NJ., Lanz RB., y O'Malley BW. 1999. Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocrine Rev.* 20:321–344.
- McKenna, NJ, y O'Malley, BW. 2002. Combinatorial control of gene expression by nuclear receptors and coregulators. *Cell*, 108:465–474.
- Meijer OC., Steenbergen PJ., y De Kloet ER. 2000. Differential expression and regional distribution of steroid receptor coactivators SRC-1 and SRC-2 in brain and pituitary. *Endocrinology*. 141:2192-2199.
- Misiti S., Schomburg L., Yen PM., y Chin WW. 1998. Expression and hormonal regulation of coactivator and corepressor genes. *Endocrinology*. 139:2493-2500.
- Mitev YA., Wolf SS., Almeida OF., y Patchev VK. 2003. Developmental expression profiles and distinct regional estrogen responsiveness suggest a novel role for the steroid receptor coactivator SRC-1 as discriminative amplifier of estrogen signalling in the rat brain. *FASEB J.* 17:518-519.
- Molenda HA., Griffin AL., Auger AP., McCarthy MM., y Tetel MJ. 2002. Nuclear receptor coactivators modulate hormone-dependent gene expression in brain and female reproductive behavior in rats. *Endocrinology*. 143:436-444.
- Nishihara E., Yoshida-Komiya H., Chan CS., Liao L., Davis RL., O'Malley BW., y Xu J. 2003. SRC-1 null mice exhibit moderate motor dysfunction and delayed development of cerebellar Purkinje cells. *J Neurosci.* 23:213-222.
- Nishihara E., O'Malley BW., y Xu J. 2004. Nuclear receptor coregulators are new players in nervous system development and function. *Mol. Neurobiol.* 30:307-326.

- Nguyen JP., Caron JP., Gaston A., Lovarn R., y Poirier J., 1984. Anatomico-radiological correlations in astrocytic cerebral tumors. *Neurochirurgie*. 30:11-15.
- Ohgaki H., y Kleihues P. 2007. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *The American Journal of Pathology*. 170:1445-1453.
- Oñate SA., Tsai SY., Tsai MJ., y O'Malley BW. 1995. Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily. *Science*. 270:1354-1357.
- Poirier J., Gray F., y Escourolle R. 1990. *Manual of basic neuropathology*. Philadelphia: W. B. Saunders Co. 22-26.
- Prieto GA., Villamar-Cruz O., Saqui-Salces M., Neri-Gómez T., Almaraz-Nieves A., Hernández-Molina VI., Rodríguez HG., y Camacho-Arroyo I. 2003. ¿Cómo actúan las hormonas esteroides?. *Educación Química*. 196-201.
- Rowan BG., Weigel NL., y O'Malley BW. 2000b. Phosphorylation of steroid receptor coactivator-1. Identification of the phosphorylation sites and phosphorylation through the mitogen-activated protein kinase pathway. *J Biol Chem* 275: 4475–4483.
- Sakakura C., Hagiwara A., Yasouka R., Fujita Y., Nakanishi M., Masuda K., Kimura A., Nakamura Y., Inazawa J., Abe T., y Yamagishi H. 2000. Amplification and overexpression of the AIB1 nuclear receptor co-activator gene in primary gastric cancers. *Int. J. Cancer*. 89:21-223.
- Shang Y., y Brown M. 2002. Molecular determinants for the tissue specificity of SERMs. *Science*. 295:2465-2468.
- Schwartz JA., Zhong L., Deighton-Collins S., Zhao C., y Skafar DF. 2002. Mutations targeted to a predicted helix in the extreme carboxyl-terminal region of the human

- estrogen receptor-alpha alter its response to estradiol and 4-hydroxytamoxifen. *J. Biol. Chem.* 277:13202-13209.
- Tata JR. 2002. Signaling through nuclear receptors. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3:702-710.
- Thenot S., Charpin M., Bonnet S., y Cavailles V. 1999. Estrogen receptor cofactors expression in breast and endometrial human cancer cells. *Molecular and Cellular Endocrinology.* 156:85-93.
- Torres-Arzayus M.I., De Mora J.F., Yuan J., Vazquez F., Bronson R., Rue M., Sellers WR., y Brown M. 2004. High tumor incidence and activation of the PI3K/AKT pathway in transgenic mice define AIB1 as an oncogene. *Cancer Cell.* 6: 263–274.
- Tsai MJ., y O'Malley BW. 1994. Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annu Rev. Biochem.* 63:451-486.
- Vienonen A., Miettinen S., Manninen T., Altucci L., Wilhelm E., y Yilkomi T. 2003. Regulation of nuclear receptor and cofactor expression in breast cancer cell lines. *European Journal of Endocrinology.* 148:469-479.
- Villamar-Cruz O., Manjarrez-Marmolejo J., Alvarado R., y Camacho-Arroyo I. 2006. Regulation of the content of progesterone and estrogen receptors, and their cofactors SRC-1 and SMRT by the 26S proteasome in the rat brain during the estrous cycle. *Brain Res. Bull.* 69:276-281.
- Weldon CB., Elliott S., Zhu Y., Clayton JL., Curiel MD., Jaffe BM., y Burow ME. 2004. Regulation of estrogen-mediated cell survival and proliferation by p160 coactivators. *Surgery.* 346-354.
- Wilson JD., y Foster DW. 1992. *Textbook of Endocrinology.* Ed Saunders Company, Philadelphia. P 35-164.

- Wu RC., Smith CL., y O'Malley BW. 2005. Transcriptional regulation by steroid receptor coactivator phosphorylation. *Endocrine*. 26:393-399.
- Xu J., Qiu Y., DeMayo FJ., Tsai SY., Tsai MJ., y O'Malley BW. 1998. Partial hormone resistance in mice with disruption of the steroid receptor coactivator-1 (SRC-1) gene. *Science*. 279: 1922–1925.
- Xu J., Glass CK., y Rosenfeld MG. 1999. Coactivator and corepressor complexes in nuclear receptor function. *Genetics & Development*. 9:140-147.
- Xu J., Liao L., Ning G., Yoshida-Komiya H., Deng C., y O'Malley BW. 2000. The steroid receptor coactivator SRC-3 (p/CIP/RAC3/AIB1/ACTR/TRAM-1) is required for normal growth, puberty, female reproductive function, and mammary gland development. *Proc Natl. Acad. Sci. USA*. 97:6379-84.
- Xu J, y Li Q. 2003. Review of the in vivo functions of the p160 steroid receptor coactivator family. *Mol Endocrinol* 17:1681–1692.
- Zhang H., Yi X., Sun X., Yin N., Shi B., Wu H., Wang D., Wu G., y Shang Y. 2004. Differential gene regulation by the SRC family of coactivators. *Genes Dev* 18:1753-1765.
- Zhou,G., Hashimoto,Y., Kwak,I., Tsai,S.Y. y Tsai,M.J. 2003. Role of the steroid receptor coactivator SRC-3 in cell growth. *Mol. Cell. Biol*. 23:7742–7755.