



UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA

---

Casa abierta al tiempo

UNIDAD IZTAPALAPA

DIVISION DE CIENCIAS BIOLOGICAS Y DE LA SALUD

MAESTRÍA EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL

“TRANSACTIVACIÓN DE PROMOTORES ESTRÓGENO REGULADOS POR LA HORMONA ESTIMULANTE DEL FOLÍCULO (FSH)”

TESIS

Que para obtener el grado de **Maestro en Biología Experimental**

PRESENTA

**Biol. Exp. María del Pilar Jiménez Aguilera**  
CODIRECTORES DE TESIS:

Dra. Ana María Pasapera Limón  
M. en B. E. Joaquín F. Herrera Muñoz

ASESORES:

Dr. Rubén Gutiérrez Sagal  
M. en B. E. Enrique Mendieta Márquez

México, D. F.

AGOSTO 2006

## **COMITE TUTORIAL**

DRA. ANA MARÍA PASAPERA LIMÓN

Unidad de Investigación Médica en Medicina Reproductiva, Hospital de Ginecología y Obstetricia, “Luis Castelazo Ayala”, Instituto Mexicano del Seguro Social. Investigadora Asociada B. [annapl@servidor.unam.mx](mailto:annapl@servidor.unam.mx).

M. en B.E. JOAQUÍN F. HERRERA MUÑOZ

Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa. Profesor titular C, Medio Tiempo. Unidad de Investigación Médica en Medicina Reproductiva, Hospital de Ginecología y Obstetricia, “Luis Castelazo Ayala”, Instituto Mexicano del Seguro Social. Investigador titular. [johemu@yahoo.com.mx](mailto:johemu@yahoo.com.mx).

DR. RUBÉN GUTIÉRREZ SAGAL

Unidad de Investigación Médica en Medicina Reproductiva, Hospital de Ginecología y Obstetricia, “Luis Castelazo Ayala”, Instituto Mexicano del Seguro Social. Investigador Asociado B. [sagalrub@hotmail.com](mailto:sagalrub@hotmail.com).

M. en B.E. ENRÍQUE MENDIETA MÁRQUEZ

Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa. Profesor Titular C, Tiempo Completo. [enme@xanum.uam.mx](mailto:enme@xanum.uam.mx).

## **JURADO**

DRA. CRISTINA ALEIDA OLIVARES SEGURA

Unidad de Investigación Médica en Biología del Desarrollo, Coordinación de Investigación en salud, Centro Médico Nacional Siglo XXI. Investigador Asociado B. [aleidaolivares@yahoo.com.mx](mailto:aleidaolivares@yahoo.com.mx).

La Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa formó parte del padrón de posgrado de excelencia del CONACYT con número de registro UAM-I: 309-0. actualmente se encuentra dentro del padrón de programas de PIFOP-CONACyT clave C/PFPN-2002-35-32.

Mi reconocimiento al CONACYT por el apoyo económico otorgado durante la realización del presente trabajo a través de la beca-crédito con número de registro 169597.

## ***JURADO DE EXAMEN***

Los integrantes del jurado, designados por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa, aprobaron la presente tesis “TRANSACTIVACIÓN DE PROMOTORES ESTRÓGENO REGULADOS POR LA HORMONA ESTIMULANTE DEL FOLÍCULO (FSH)” el día 31 de Agosto del año 2006.

---

*M. en B. E. Enrique Mendieta Márquez*  
***PRESIDENTE***

---

*Dr. Rubén Gutiérrez Sagal.*  
***SECRETARIO***

---

*Dra. Cristina Aleida Olivares Segura.*  
***VOCAL***

**Dedico este trabajo a las personas a quienes debo todo mis padres Ma. Elena y Víctor, gracias por darme lo mejor de ustedes**

A mis hermanas: Martha y Erika quienes siempre me han dado todo su apoyo y cariño incondicionalmente.

A mi Tutora la Dra. Ana Maria Pasapera Limón, por permitirme trabajar con ella; Así como por los conocimientos adquiridos bajo su tutela.

Al M. En B. E. Joaquín Herrera Muñoz, por todo su apoyo, tiempo y conocimiento.

Al M. en B. E. Enrique Mendieta, al Dr. Rubén Gutiérrez y a la Dra. Aleida Olivares por compartir con migo su tiempo y conocimiento.

A Cesar Rangel quien compartió con migo esta etapa de mi vida y a quien le agradezco su paciencia y apoyo

De forma muy especial les agradezco ala Dra. Aída Uribe y Marco Alan Pérez, ya que sin su ayuda, tiempo, conocimientos y amistad hubiera sido más difícil mi estancia en este lugar

A mis compañeros y amigos del laboratorio: David, Pablo, Norma, al Dr. Fabián Arechavaleta por todo el apoyo que me brindaron durante el tiempo que estuve en este lugar.

## RESUMEN

Los receptores de estrógenos así como diversas vías de transducción de señales mediadas por AMPc actúan recíprocamente en varios tejidos blancos incluyendo el ovario, la glándula mamaria y útero. En este sentido, la hormona estimulante del foliculo (FSH) activa la vía del AMPc el cual a su vez activa diferentes vías de señalización que conllevan al crecimiento y diferenciación celular. Hasta el momento no ha sido bien determinado como la FSH puede activar a los REs en la ausencia de estradiol. Para explorar este problema, nosotros analizamos la activación de los REs inducida por la FSH humana así como la transactivación de los genes reporteros sensibles a estrógenos en células L RE<sup>+</sup>; que expresan el receptor de FSH humano establemente [células L-(hFSHR<sup>+</sup>)], se intentó determinar las vías de señalización involucradas en este proceso. Las células L-(hFSHR<sup>+</sup>) son temporalmente transfectadas con los genes reporteros 3XERE-TATA-Luc o VitA2-TK-CAT y tratadas con FSH o activadores de PKA (la toxina de cólera, forskolina y 8-Br-AMPc) en la presencia o ausencia de varios inhibidores de cinasas. Se encontró que la FSH y todos los activadores de PKA, activan específicamente REs e inducen la activación de ambos genes reporteros. La transactivación de los genes sensibles a estrógenos por FSH o activadores de PKA son eficazmente (~90%) bloqueados por H89 (inhibidor de PKA) y LY294002 pero no por Wortmanina (inhibidores de las cinasas PI-3), 4-OH-tamoxifeno o ICI182,780; PD98059 (inhibidor de ERK 1/2) y SB203580 (inhibidor de p38MAPK) bloquean parcialmente (~20 -30 %) el efecto mediado por FSH. La combinación de FSH y estradiol produce un aumento significativo (>5 veces) en la transactivación comparado con lo observado en células tratadas con el estradiol solo y este aumento es atenuado por antiestrógenos. Adicionalmente analizamos la participación del coactivador SRC-1 y la proteína de unión (CBP) proteína de unión (CREB) a elementos que responden a AMPc en la activación de RE realizada por FSH; nosotros vimos que CBP pero no SRC-1 potencian la activación transcripcional inducida por FSH en ambos reporteros sensibles RE, pero este efecto es más fuerte en el reportero ERE-VitA2-TK-CAT que en el 3XERE-TATA-Luc. Para esto, en células L-(hFSH<sup>+</sup>) la FSH induce activación transcripcional de genes sensibles a estrógenos a través de un camino de ERK 1/2 y p38MAPK. PI3-K aparentemente no es involucrado en este proceso mediado por FSH cuando LY294002, pero no Wormanina se une específicamente a los REs y bloquea completamente la acción estrogénica. Presumiblemente, CBP coopera con el RE en genes que contienen elementos que responden a estrógenos a través de mecanismos que involucran la participación de otras proteínas y/o factores de transcripción basal (e.g.CREB), las cuales que median la respuesta transcripcional de genes reporteros sensibles a estrógenos por estimulación con FSH.

## **ABSTRACT.**

Estrogen receptors and cAMP – mediated signaling pathways interact in several target tissues including the ovary, mammary gland and uterus. On the other hand, FSH via cAMP activates several signaling pathways leading to cell growth and differentiation. The mechanism (s) whereby FSH may activate ERs in the absence of estradiol and evoke specific estrogen-regulated responses has not been fully established. To explore this issue, we analyzed human follicle-stimulating hormone (FSH)-induced cell proliferation and transactivation of estrogen-sensitive reporter genes in L cells stably expressing the human FSH receptor [L-(hFSHR+) cells]. In order to dissect the signaling pathways involved in this process, L-(hFSHR+) cells were transiently transfected with either the 3X-ERE-TAT-Luc or the ERE-VitA2-TK-CAT reporter genes and treated with FSH or PKA activators (cholera toxin, forskolin and 8-Br-cAMP) in the presence or absence of various kinase inhibitors. We found that FSH and all PKA activators, specifically induced transactivation of both reporter genes. Transactivation of estrogen-sensitive genes by FSH or PKA activators were blocked (~90%) by H89 (PKA inhibitor) and LY294002 but not by Wortmannin (PI3-K inhibitors), 4-OH-tamoxifen, ICI182,780 or SB203580 (p38 MAPK inhibitor); PD98059 (ERK1/2 inhibitor) partially (~30%) blocked the FSH-mediated effect. The combination of FSH and estradiol resulted in a synergistic effect on transactivation as well as on cell proliferation, and this enhancement was attenuated by antiestrogens. We additionally analyzed the participation of the coactivators SRC-1 and cAMP response element binding protein (CREB)-binding protein (CBP) in FSH-evoked estrogen receptor (ER)-dependent transactivation; we found that CBP but not SRC-1 potentiated FSH-induced transcriptional activation of both ER-sensitive reporters, being this effect stronger on the ERE-VitA2-TK-CAT than on the 3X-ERE-TAT-Luc reporter. Thus, in L-(hFSHR+) cells FSH induces transcriptional activation of estrogen-sensitive genes through an A-kinase-triggered signaling pathway, using also to a lesser extent the ERK1/2 and p38 pathways. PI3-K is not apparently involved in this FSH-mediated process since LY294002, but not Wortmannin, specifically binds ERs and completely blocks estrogen action. Presumably, CBP cooperates with the ER on genes that contain estrogen responsive elements through mechanisms involving the participation of other proteins and/or basal transcription factors (e.g. CREB), which in turn mediate the transcriptional response of estrogen-sensitive reporter genes to FSH stimulation.



## INDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1.1. <i>Los receptores de Estrógenos.....</i>	<i>1</i>
1.1.1. Activación del receptor de estrógenos independiente del ligando.....	4
1.2 El receptor de la FSH.....	5
1.3 Señales de transducción.....	7
1.4 Ovarios.....	9
<b>2 JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>13</b>
<b>3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....</b>	<b>13</b>
<b>4. OBJETIVO GENERAL.....</b>	<b>14</b>
4.1 Objetivos Particulares .....	14
<b>5. HIPÓTESIS .....</b>	<b>15</b>
<b>6. MATERIAL Y METODOS .....</b>	<b>16</b>
6.1. <i>Químicos .....</i>	<i>16</i>
6.2. <i>Construcciones génicas .....</i>	<i>16</i>
6.3. <i>Ensayo de unión al receptor .....</i>	<i>18</i>
6.4. Inmunocitoquímica.....	18
6.5. Cultivo celular y transfecciones.....	19
6.6. <i>Western blots.....</i>	<i>20</i>
6.7. <i>RIA de AMPc .....</i>	<i>21</i>
6.8 <i>Ensayo de CAT.....</i>	<i>21</i>
6.9. Ensayo de la actividad de la Luciferasa.....	22
6.10 Ensayo de la actividad de la $\beta$ -galactosidasa.....	22
<b>7. RESULTADOS.....</b>	<b>23</b>
7.1 El Estradiol y la FSH inducen activación transcripcional del gen reportero 3X-ERE-TATA-Luc en células L. ....	23
7.2. La hormona folículo estimulante induce transactivación de genes reporteros sensibles a estrógenos en células CV1 que expresan transitoriamente el RFSH humano y RE $\alpha$ o RE $\beta$ .....	25

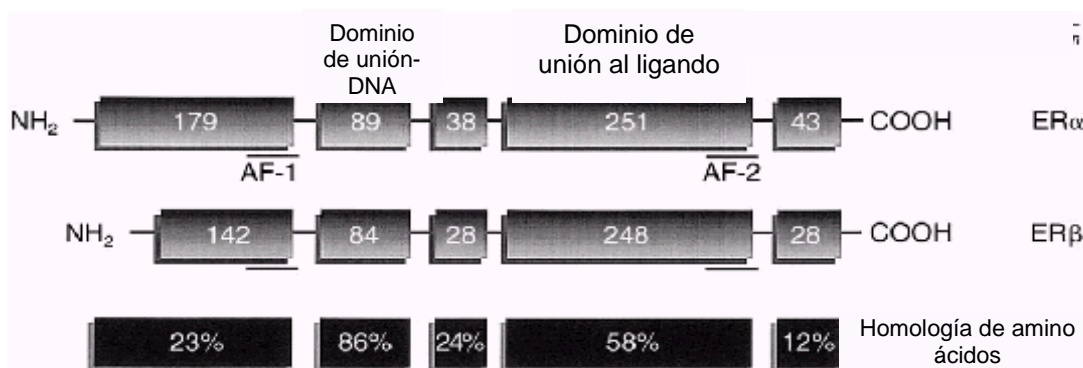
7.3. Efecto de activadores de PKA, inhibidores de cinasas y antiestrógenos, en la activación transcripcional del gen blanco sintético 3X-ERE-TATA-Luc.....	28
7.4. CBP aumenta la transactivación estimulada por FSH de un gen reportero sensible a estrógenos.....	32
7.5. La estimulación de la expresión de genes dependientes del RE por la FSH ocurre en el contexto de varios promotores que contienen ERE.....	34
<b>8. DISCUSION .....</b>	<b>36</b>
<b>9. CONCLUSIONES.....</b>	<b>41</b>
<b>10. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>42</b>

# 1. INTRODUCCIÓN

## *1.1 Los receptores de estrógenos*

El estradiol es un esteroide sexual que ejerce numerosos efectos en tejidos blanco involucrados en la función reproductiva [1]. El estradiol se produce principalmente en las células de la granulosa de los folículos ováricos en respuesta a las acciones combinadas de las gonadotropinas hipofisarias, la hormona luteinizante (LH) y la hormona estimulante del folículo (FSH). Los efectos inducidos por los estrógenos están mediados por dos tipos de receptores productos de dos genes diferentes, el receptor de estrógenos  $\alpha$  (RE $\alpha$ ) [2] y el receptor de estrógenos  $\beta$  (RE $\beta$ ) [3].

Estos receptores pertenecen a la superfamilia de factores de transcripción que están relacionados estructuralmente y son activados por su ligando [4]. Los REs en el humano están compuestos de aproximadamente 530 y 595 (RE $\beta$  y RE $\alpha$  respectivamente) aminoácidos con un peso molecular aproximado de 66 - 70 kDa para el RE $\alpha$  y 53 – 59 kDa para el RE $\beta$ . Estos receptores se caracterizan por tener 6 regiones funcionales: un dominio amino-terminal hipersensible que contiene la función de activación 1 (AF-1); Un dominio de unión al ADN (DBD) altamente conservado, que contiene 2 dedos de zinc los cuales son responsables de la unión de los REs a los elementos de respuesta a estrógenos (ERE) localizados generalmente en la región promotora de los genes blanco o estrógeno-regulados; la región bisagra, la cual separa al dominio de unión al ligando del dominio de unión al ADN; y el dominio de unión al ligando (LBD), el cual forma una especie de bolsa hidrofóbica responsable de la unión del ligando, que cuando une al ligando y con la participación de la  $\alpha$ -hélice 12 provocan cambios conformacionales de la región nominada función de activación 2 (AF-2) [5-10] (Fig. 1).

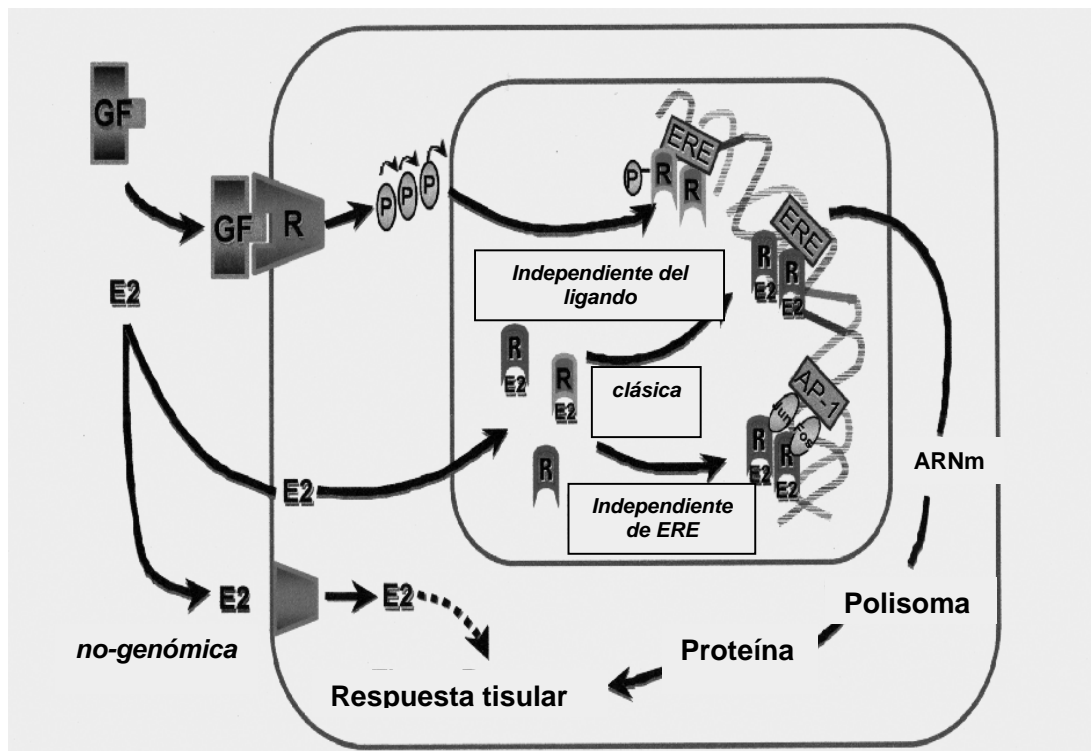


**Figura 1.** Los estrógenos y los antiestrógenos ejercen sus actividades biológicas a través de 2 receptores distintos, el RE $\alpha$  y el RE $\beta$ . Los números indicados en las cajas representan los porcentajes de homología entre los diferentes dominios.

Aunque son muchos los factores que intervienen en la activación de la actividad transcripcional del RE $\alpha$  dependiente de AF-1 y AF-2, ambas regiones actúan simultáneamente para brindar una activación sinérgica de la transcripción [11]. Los mecanismos a través de los cuales los REs activan la expresión de sus genes blanco han sido objeto de intensa investigación en los últimos años y se ha descrito que la forma clásica de activación transcripcional ocurre después de que el ligando [17 $\beta$ -estradiol (E $_2$ )] se une al RE en el núcleo de la célula. Dicha unión provoca una sucesión de cambios bioquímicos y estructurales en el receptor, incluyendo transiciones conformacionales provocados por la fosforilación de residuos de serina específicos, así como homo o heterodimerización de receptores, para finalmente unirse a secuencias específicas localizadas en los promotores de genes blanco conocidas como elementos de respuesta a estrógenos (ERE) (Fig. 2) [6,12,13]. Los ERE consisten de una secuencia consenso que es palindrómica de las bases nucleotídicas **GGTCAnnnTGACC** [14].

Cuando los REs son activados por un ligando (agonista o antagonista) estos receptores adquieren la capacidad de reclutar un número diverso de factores reguladores de la transcripción (coactivadores y co-represores) que son expresados de manera específica

de célula o de tejido, y regulan la transcripción de manera positiva (coactivadores), o negativa (co-represores). [10, 15].



**Figura 2.** Mecanismos involucrados en la señalización provocada por estradiol y su receptor. Se señalan 4 vías: 1. La clásica, dependiente del ligando; 2. La independiente del ligando (p.e., factores de crecimiento); 3. La vía independiente de elementos de respuesta a estrógenos (ERE) y 4. La señalización no-genómica, de superficie celular.

Tanto el RE $\alpha$  y el RE $\beta$  son capaces de activar la transcripción génica a través de su unión con las secuencias EREs, siendo menor la eficiencia de transactivación inducida por el RE $\beta$  que por el RE $\alpha$ , hecho que se explica por la menor afinidad que muestran los complejos RE $\beta$  por las secuencias de ERE. A pesar de que muchos aspectos de la regulación transcripcional inducida por los RE $\alpha$  y RE $\beta$  son compartidos, se han documentado ciertas diferencias importantes entre ambos receptores, una de ellas implica el efecto de agonista parcial que presenta el antiestrógeno 4-hidroxi-tamoxifeno (4-OH-

TAM) vía el RE $\alpha$  y de antagonista total vía RE $\beta$  [16], estos resultados han sido demostrados tanto “*in vitro*” en estudios de transactivación de genes reporteros gobernados por EREs [17-22] como “*in vivo*” [23-26]. Estas diferencias se han atribuido principalmente a la baja homología que presentan ambos receptores en su región AF-1 [16, 27].

### ***1.1.1 Activación del receptor de estrógenos independiente del ligando***

Hasta hace pocos años, se aceptaba como un dogma que la unión del ligando era prerequisite indispensable para que sucediera la activación de los receptores de hormonas esteroideas como factores de transcripción. Se consideraba que solo la unión del esteroide a su receptor era capaz de provocar los cambios conformacionales necesarios para activar al receptor, provocar su dimerización y posteriormente la inducción de la función transactivadora AF-2. Sin embargo, en los últimos años, se ha demostrado que la función del RE puede ser modulada por señales extracelulares que provocan la activación de vías alternas de transducción de señales en ausencia de E<sub>2</sub> (Fig. 2) [28,29]. De hecho, el factor de crecimiento epidermal (EGF) o el factor de crecimiento semejante a la insulina (IGF-1), inducen la cascada de transducción de señales vía cinasas activadas por mitógenos (conocidas como MAP cinasas por Mitogen-Activated Protein; *vide infra*), la cual puede potencialmente provocar la fosforilación del receptor en residuos de serinas, específicamente de la Ser118 del RE $\alpha$ , estimulando así la actividad transcripcional de este receptor [30-32]. De igual manera, se ha demostrado que la activación de las MAP cinasas (MAPK), en respuesta al estímulo con EGF o por transfección de una forma activa dominante de ras, [proteína G pequeña involucrada en la señalización intracelular de una gran variedad de receptores membranales con actividad de cinasa de tirosinas (TK)] induce la fosforilación de RE $\beta$  y, en consecuencia, la actividad transcripcional del mismo [33], evento que es acompañado por el reclutamiento del coactivador del receptor de esteroideas (Src-1) dependiente de fosforilación [34]. Los mecanismos de convergencia de las vías dependientes de los REs y los factores de crecimiento no han sido completamente

dilucidados. Sin embargo, los estudios sugieren que cada vía puede ser dependiente de la otra para que se expresen totalmente las respuestas mediadas por ambos ligandos. De hecho, en el útero de ratón, el tratamiento con anticuerpos contra el EGF atenúa las respuestas uterinas al E<sub>2</sub> y la administración de antagonistas del RE reduce la respuesta uterina al factor de crecimiento [31]. Más aún, los animales “noqueados” para el ER $\alpha$  ( $\alpha$ ERKO) pero que expresan normalmente el factor de crecimiento epidérmico y su receptor, no responden a las acciones mitogénicas de este factor [35]. Cabe señalar que, además de estos factores de crecimiento, se ha demostrado la activación del RE $\alpha$  en ausencia del ligando inducida por algunas hormonas cuyos receptores están acoplados a las proteínas G, como la dopamina y la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH) [36-42]. Para la GnRH, esta activación ocurre a través de señales mediadas por la vía de las MAPKs (ERK1/ERK2) [42].

Por otra parte, se ha demostrado que el RE $\alpha$  puede ser activado a partir de una gran variedad de cinasas de proteínas, las cuales son activadas por receptores localizados en la superficie celular de la membrana plasmática incluyendo la vía AMPc/ proteína cinasa A (PKA) [43,44-47], proteína cinasa C (PKC) [7,42,48] , fosfatidilinositol 3 (PI3) dependiente de cinasas (PI3-K)/Akt [49,50] y la vía de cinasa activada mitogenicamente (MAPK) [31,51,52]. La expresión selectiva de los receptores por estos ligandos; junto con diferencias en las isoformas del RE y la expresión de proteínas coactivadoras / co-represoras teniendo en cuenta el efecto celular y promotor específico de los REs activados [9,11,12,16,27]. En particular, los REs pueden interactuar con vías de transducción de señales mediadas por PKA y MAPK para ejercer efectos proliferativos en una variedad de sistemas celulares [52,53].

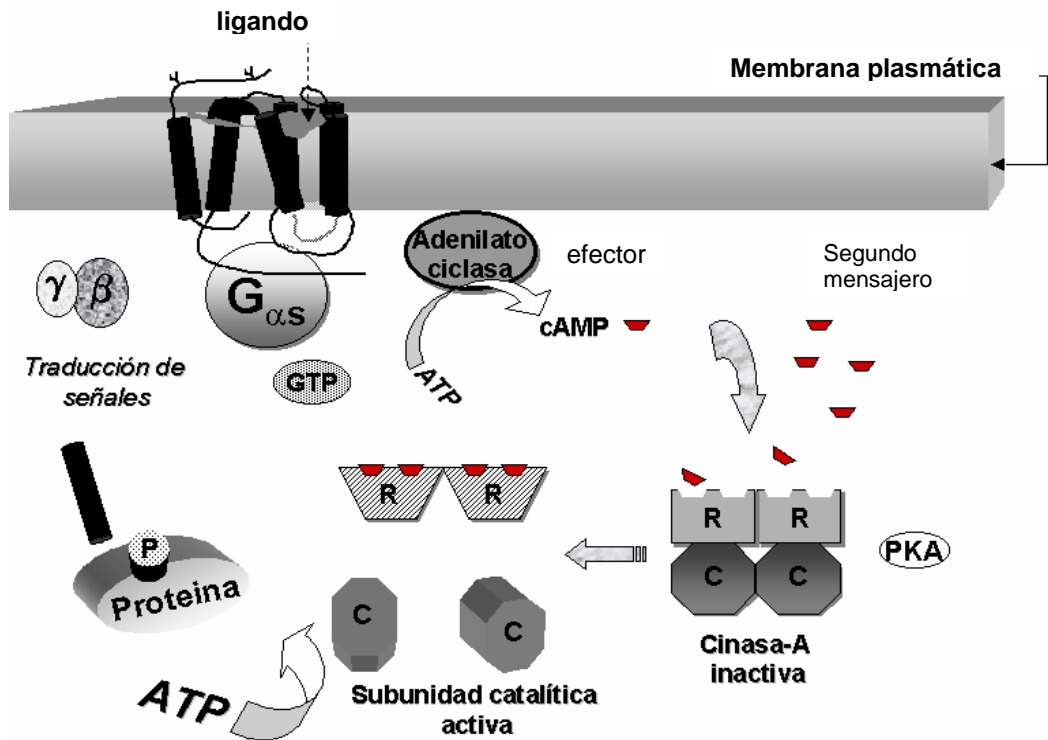
## ***1.2 El receptor de la FSH***

La Hormona Folículo Estimulante (FSH) es una glicoproteína sintetizada y secretada por la hipófisis anterior o adenohipófisis. Estructuralmente esta constituida por dos subunidades ( $\alpha$  y  $\beta$ ) unidas entre sí mediante enlaces no covalentes [54, 55]. La FSH

regula la producción estrogénica y juega un papel importante en el crecimiento folicular y la gametogénesis. Dependiendo del estado de desarrollo folicular, esta gonadotropina regula la proliferación de las células de la granulosa, la expresión de las moléculas reguladoras del ciclo celular y la activación de genes específicos de diferenciación incluyendo el de la citocromo P450 aromatasa, los receptores de la hormona luteinizante y genes activadores de tejidos tipo plasminógeno en el desarrollo de células de la granulosa [56].

Los receptores de FSH (RFSH) pertenecen a la superfamilia de los receptores acoplados a proteínas G [57]. Estos receptores se caracterizan por estar formados de una cadena única de aminoácidos, que atraviesa repetidamente y en ambas direcciones la membrana celular formando 7 dominios transmembranales unidos por 3 asas extracelulares y 3 intracelulares y con una región amino-terminal extracelular y otra carboxilo-terminal intracelular de extensión variables [58,59,60]. Es conocido que cuando los RFSH son activados por su ligando, estos desencadenan la activación de una cascada importante de diferentes señales intracelulares mediadas por las proteínas G activadas. Las proteínas G son moléculas transductoras de señal que se unen a nucleótidos GTP, a diferencia de las formas inactivas que poseen la característica de unirse a GDP [57]; en particular, la proteínas Gs (proteínas G estimulatorias) y en menor grado las Gq/11 y Gi (proteínas G inhibitorias) son las que se acoplan al receptor de la FSH [61]. La activación de la subunidad  $\alpha$  de la proteína Gs activa a su vez a una enzima membranal efectora, la adenilato ciclasa, la cual promueve la formación del 3'5' AMP cíclico (AMPc), este mensajero intracelular activa a su vez a la PKA (Proteína Cinasa A), iniciándose de esta forma la cascada de fosforilación de proteínas que incluyen a la proteína CREB, la cual une a elementos que responden a AMPc (CRE), culminando con la activación de la transcripción y síntesis de proteínas. (Fig. 3) [62].



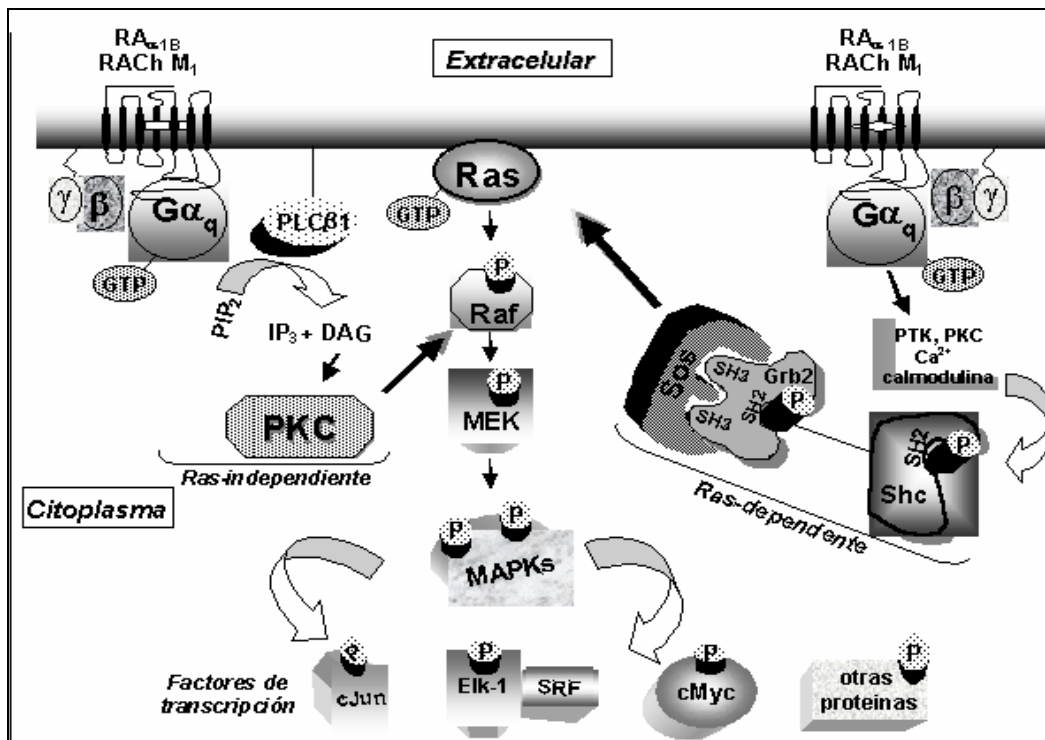


**Figura 3.** Vía de señalización intracelular mediada a través de la proteína Gs. El estímulo del receptor por el ligando activa a la subunidad  $\alpha$  de la proteína Gs, la cual a su vez activa a la enzima adenilato ciclasa para la producción de AMPc. Este mensajero promueve la activación de la cinasa A de proteínas (PKA) iniciándose así una cascada de fosforilación proteína-proteína.

### 1.3 Señales de transducción.

Esta vía de señalización intracelular, caracterizada por una cascada de fosforilaciones proteína-proteína, se encuentra estrechamente relacionada con procesos celulares como el crecimiento, la diferenciación, el desarrollo, la respuesta a estrés, la determinación morfológica, el aprendizaje, la memoria y la proliferación, así como con otras actividades biosintéticas de la célula. Se han identificado hasta la fecha 3 cascadas pertenecientes a esta vía: la de las ERK (por Extracelular Signal-Regulated Kinase), JNK (por Jun N-terminal Kinase), y p38 MAPK. Sin embargo; se ha reportado un mayor número de evidencias que demuestran que la activación del RFSH además de estimular la vía de señalización adenilato ciclasa/AMPc/PKA, la cual es capaz de activar otras vías

intracelulares que incluyen a la vía de las MAPK y PI3-K/Akt involucradas en proliferación y supervivencia celular [62-66]. En efecto, en células de la granulosa, el tratamiento con FSH provoca la fosforilación y activación de PKB o Akt, lo cual puede ocurrir a través de las vías activadas por PKA o PKC, vía proteína  $G\alpha_s$  o vía el dímero  $G\beta\gamma$ , de manera dependiente o independiente de Ras [58,59,64], de manera muy similar a lo que se sucede cuando se estimula con IGF-1 (Fig. 4) [64]. La activación de estas cascadas culmina eventualmente con la activación de diversos factores de transcripción como c-Jun, Elks y de acuerdo a nuestros datos preliminares (*vide infra*), el RE. Como se menciono previamente, los estrógenos pueden indirectamente activar esta vía particular de señalización intracelular a través de mecanismos autócrinos o parácrinos que involucran la síntesis y activación de ciertos factores de crecimiento de esta manera provoca la proliferación celular [67]; de hecho, en células MCF-7 (procedentes de tumor mamario), el  $E_2$  induce la activación de ERKs a través de la vía heergulina (HRG)/HER-2/PKC- $\delta$ /Ras. Esta vía podría ser la responsable de los efectos del  $E_2$  en la promoción del crecimiento y proliferación celular durante estadios tempranos de la progresión tumoral [67]. La activación de estas vías alternativas; aparentemente permite un mejor control de la esteroidogenesis estimulada por gonadotropinas [56,66], la proliferación celular y el proceso apoptótico en los niveles del ovario [56,64]. Considerando el efecto derivado de la acción concentrada de FSH y estradiol ( $E_2$ ) en el crecimiento y diferenciación de células de la granulosa [68,69].



**Figura 4.** Vía dependiente (derecha) e independiente (izquierda) de Ras a través de las cuales se activan las cinasas MAP (MAPK o ERK) en respuesta a la activación del receptor  $\alpha_{1B}$ -adrenérgico y M1-muscarínico, acopladas a la proteína Gq.  $G\alpha_q$  activa a la fosfolipasa  $C\beta_1$  lo cual resulta en la conversión de fosfatidilinositol 4,5-difosfato a inositol 1,4,5-trifosfato ( $IP_3$ ) y diacilglicerol ( $DAG$ ), el cual a su vez contribuye a la activación de la cinasa C de proteínas (PKC); la activación de PKC es mimetizada por ésteres del forbol como el PMA. La PKC activa a la cinasa Raf, desencadenándose la cascada independiente de Ras. La subunidad  $G\alpha_q$  interactúa con otras moléculas de señal para activar la cascada de las cinasas MAP a través de Ras.

#### 1.4 Ovarios

Los ovarios son los encargados de producir las hormonas (estrógenos y progesterona) que aseguran el adecuado funcionamiento de todos los órganos sexuales. Así, éstas ayudan a conservar la humedad normal de la vagina, inducen la ovulación y mantienen la regularidad de los ciclos menstruales. Los ovarios están constituidos por diferentes tipos celulares; los cuales expresan diferentes receptores; células de la teca; y células de la granulosa. Las primeras tienen receptores para la LH, de cuya activación depende la puesta en marcha de la esteroidogénesis. Y las últimas. Poseen receptores para la FSH y, en la segunda mitad del ciclo, también expresan receptores para la LH. Tanto las

hormonas ováricas (estrógenos y progesterona) así como las gonadotropinas hipofisiarias (FSH, LH) regulan el ciclo menstrual, el cual consta de dos etapas que se encuentran separadas por la ovulación. La gonadotropina que actúa principalmente en la primera mitad del ciclo menstrual es la FSH, con diferentes funciones: induce un aumento de sus propios receptores, potenciando la respuesta en las células de la granulosa; potencia la actividad aromatasa de la granulosa, lo que conduce a un aumento de estrógenos (la aromatasa cataliza el paso de andrógenos provenientes de la teca a estrógenos); e induce en las células de la granulosa la expresión de receptores para LH en las fases finales del ciclo. A su vez estas acciones son potenciadas por los estrógenos, que van aumentando progresivamente en esta fase, autopotenciando el sistema, que, por un mecanismo de retroalimentación positiva desencadenan la ovulación [70].

La LH estimula el crecimiento de la teca, produciéndose andrógenos, que, por su carácter lipídico, pasan fácilmente a la granulosa donde son utilizados para la síntesis de estrógenos. La activación de la aromatasa de la granulosa sólo ocurre ante niveles elevados de FSH. Por tanto los estrógenos que son bajos en la primera semana del ciclo, se elevan considerablemente en la segunda, aumentando progresivamente hasta alcanzar su máximo pico poco antes de la ovulación. Como la aromatización en la granulosa depende del sustrato de andrógenos que le depara la teca, la secreción estrogénica preovulatoria es el resultado del estímulo combinado de FSH y LH sobre los dos tipos celulares de la teca y de la granulosa.

La ovulación se produce por el pico de LH, a su vez inducido por la secreción de estrógenos: así pues el propio ovario regula la ovulación. La presencia de LH a partir de este momento del ciclo supondrá los siguientes cambios: a) Activa la maduración del ovocito, reanudando su meiosis; b) Produce la luteinización de la granulosa, preparándola para un aumento en la producción de progesterona y c) Produce la síntesis de prostaglandinas necesarias para la ruptura del folículo [70].

Por acción de la LH se rompe el folículo y las células de la granulosa se ven inundadas de sangre con LDL-colesterol. Existe una nueva situación respecto a la fase preovulatoria y es que sólo ahora tras la ovulación se permite la síntesis de progesterona principalmente y 17-hidroxiprogesterona, pues llega el colesterol sanguíneo, que previamente era consumido en la esteroidogénesis de la teca, a la granulosa. Además de que la ausencia de vascularización de la granulosa en la fase previa hacía que la escasa progesterona producida difundiera hacia la teca, donde sería utilizada en la producción de andrógenos; hay una falta de dotación enzimática de la P450c17 en la granulosa preovulatoria y existe ya un suficiente número de receptores para la LH (luteinización de la granulosa) y un nivel elevado de LH circulante. Tras la ovulación se alcanza un máximo de producción de la progesterona hacia el día 21 del ciclo, manteniéndose hasta el día 25, a partir del cual desciende gradualmente. La secreción pulsátil de la LH es necesaria para la correcta secreción de estradiol y progesterona, mientras que estos productos inhibirán por su retroalimentación negativa la secreción de gonadotropinas, con lo que su nivel baja. El agotamiento de cuerpo lúteo conduce a la menstruación [70].

Planteado lo anterior se puede considerar que cuando las células de la granulosa, son tratadas con FSH provocan la fosforilación y activación de PKB o Akt, lo cual puede ocurrir a través de las vías activadas por PKA o PKC. La activación de estas cascadas culmina eventualmente con la activación de diversos factores de transcripción y de acuerdo a nuestros datos preliminares, el RE. Como se mencionó previamente, los estrógenos pueden indirectamente activar esta vía particular de señalización intracelular a través de mecanismos autócrinos o parácrinos que involucran la síntesis y activación de ciertos factores de crecimiento que de esta manera provoca la proliferación celular [67]. La activación de estas vías alternativas; aparentemente permite un mejor control de la esteroidogénesis estimulada por gonadotropinas [56,66], la proliferación celular y el proceso apoptótico en los niveles del ovario [56,64]. Considerando el efecto derivado de la acción concentrada de FSH y estradiol ( $E_2$ ) en el crecimiento y diferenciación de células de la granulosa [68,69]. Esta vía podría ser la responsable del crecimiento y proliferación celular durante estadios tempranos de la de la progresión tumoral [67].

Además de tratar de demostrar la existencia de cierto grado de comunicación entre las vías de señalización activadas por receptores acoplados a proteínas G (RFSH) y los receptores a hormonas esteroideas [18], En este estudio, exploramos el efecto de la FSH en la activación transcripcional de genes sensibles al RE. Para este propósito, analizamos la transactivación inducida por FSH de genes reporteros sensibles a estrógenos en células L RE<sup>+</sup> (derivadas de tejido adiposo y areolar subcutáneo de ratón) que expresan de manera estable el RFSH humano (células L-(hFSHR<sup>+</sup>) [71]

## **2. JUSTIFICACIÓN**

En los últimos años se ha sugerido que la FSH podría tener efectos mitogénicos en ciertos tipos celulares, de hecho, los efectos mitogénicos de la FSH podrían estar mediados a través de la activación de los REs, lo que podría influir en el desarrollo y progresión de neoplasias epiteliales del tejido ovárico por el estímulo sobre el epitelio superficial de esta glándula [72]. Recientemente se ha informado que el epitelio superficial ovárico y algunas líneas celulares de cáncer ovárico (como la línea OCC1) expresan receptores para FSH y proliferan en presencia de esta gonadotropina [72,73]. Más aún, el cáncer ovárico es más frecuente en condiciones asociadas a gonadotropinas circulantes elevadas, como la postmenopausia o en mujeres que han recibido tratamiento para inducir la ovulación [74,75]. Si se considera que el cáncer ovárico es la neoplasia más letal entre los cánceres ginecológicos (se estima que este tipo de neoplasia causa aproximadamente 13,900 muertes por año en la Unión Americana) [76], el análisis de las vías intracelulares involucradas en los efectos estrogénicos provocados por la FSH cobra gran importancia.

## **3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Se desconocen las posibles rutas de señalización intracelular que podrían mediar los efectos de tipo estrogénicos de la FSH, ya que la PKA puede activar a la vez varias vías de transducción que pueden potencialmente activar el RE. La pregunta fundamental es si la activación del RE en respuesta a la FSH ocurre como un efecto directo de PKA, o indirectamente a través de Akt o MAPKs, incluyendo p38 y ERK1/ERK2; o aún de PKC. Con relación a esto, se propuso estudiar la actividad transcripcional del RE cuando es activado por FSH (así como por diversos activadores de PKA y PKC), E<sub>2</sub>, algunos antiestrógenos como el 4-OH-tamoxifeno y el ICI 182, 780, en un contexto promotor y célula específicos.

#### **4. OBJETIVO GENERAL**

Analizar la activación del receptor de estrógenos en respuesta al estímulo con la FSH, mediante ensayos de expresión transitoria de un gene reportero sensible a estrógenos.

##### **4.1 Objetivos Particulares**

- Estudiar las características funcionales de los REs expresados naturalmente en la línea celular L, transfectada de manera estable con el ADNc del receptor humano de la FSH.
- Construir el plásmido que contenga 3 elementos de respuesta a estrógenos unidos a un promotor mínimo que consta de la secuencia de la caja TATA consenso unidos a su vez al ADNc de la enzima que codifica para la luciferasa de luciérnaga (plásmido reportero 3X-ERE-TATA-Luc).
- Analizar la transducción de señal mediada por el receptor de FSH expresado de forma estable en células L, a partir del análisis de la transactivación del reportero 3X-ERE-TATA-Luc inducido por FSH y el E<sub>2</sub> como control.
- Analizar el efecto de análogos del AMPc y activadores de la proteínas Gs y Gq/11 (toxina del cólera activador de proteínas G, forskolina activador de adenilato ciclasa; 8-Br-AMPc antagonista del AMPc).
- Analizar el efecto de ciertos bloqueadores y activadores específicos de diferentes vías de transducción de señales intracelulares (calfostin C inhibidor de PKC; Éster de forbol (PMA) activador de PKC; H89 inhibidor de PKA; PD 98059 inhibidor de ERK1/2; SB 203580 inhibidor de p38 MAPK; LY 294002 y Wormanina inhibidores de PI3-k) que podrían estar potencialmente involucradas en la activación del RE mediado por la FSH Así como algunos antiestrógenos (ICI 162,780 y el 4-OH tamoxifen).



## **5. HIPÓTESIS**

El receptor de estrógenos puede ser activado por señales extracelulares independientes de su ligando natural, posiblemente a través de vías de señalización inducidas por la cinasa A de proteínas ó por la cinasa C de proteínas y sus activadores. La FSH induce aumento de AMPc intracelular, activando la PKA, la cual provocará la activación del RE por fosforilación transactivando genes reporteros sensibles a estrógenos.

## 6. MATERIAL Y METODOS

### 6.1. Químicos

El 17 $\beta$ - estradiol, 4-hidroxi-tamoxifeno (OH-TAM), noretisterona, 8-Br-AMPC, forskolina y toxina de cólera fueron obtenidos de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). (Dicloroacetil-1-<sup>14</sup>C)- cloranfenicol (actividad específica, 5301 mCi/mmol), [2,4,6,7-<sup>3</sup>H] 17 $\beta$ - estradiol (actividad específica, 93Ci/mmol), y [<sup>32</sup>P]- $\gamma$ ATP de AMERSHAM Pharmacia Biotech Ltd (Buckinghamshire, UK). ICI182, 720 fue obtenido de AstraZeneca Ltd (London, UK). Inhibidores de cinasas como PD98059 [inhibidor de MEK1 proteínas cinasas de cinasas activadas por mitógenos], SB203580 [inhibidor de proteína de cinasa 2a (p38) - activada por stress] y H89 (inhibidor de PKA), son de Santa Cruz Biochemical Inc. (Santa Cruz, CA). LY294002 y Wormanina (inhibidores de PI3-cinasa) son de Calbiochem (Calbiochem- Novabiochem Co. , San Diego, CA) y Calfostin C (inhibidor de PKC) es de Sigma. La FSH pituitarica humana altamente purificada fue provista por DR. James A. Dias (David Axelrod Institute for Public Health, Wadsworth Center, NYSDOH, Albany, NY). Todos los medios y antibióticos para los cultivos celulares fueron comprados de Life Technologies (Gaithersburg, MD, USA).

### 6.2. Construcciones génicas

El vector reportero utilizado en este estudio fue el 3X-ERE-TATA-Luc (donado amablemente por el Dr. Donald McDonnell, Duke University, NC) [11], el ERE-VitA2-TK-CAT [77], y un plásmido reportero de luciferasa derivado del promotor de uteroglobina. La clonación de la región del promotor de la uteroglobina fue llevada a cabo por PCR usando DNA genómico aislado de hígado, como se describe previamente [78]. Un microgramo de DNA fue amplificado en un volumen de 50  $\mu$ l usando 80 pmol del iniciador UG-L2 (5'-GAG AGC CAG GGT GAC CAG GGC GAG GGT GAT GG-3') y UG-L3 (5'- TGG GAA CCA CCA CCA CTC AAG AGC AGT-3'). La reacción se sometió a 30 ciclos a 94°C por 20 segundos, 63 °C por 2 min., y 72°C por 10 min. El producto de la

reacción se fraccionó por electroforesis en geles de agarosa y visualizados bajo radiación UV. La banda de ~900 pb se cortó y el DNA se recuperó y clonó en el plásmido pGEM-T (Promega) para crear el plásmido pLUGO.9. Tres clones independientes se secuenciaron en ambas direcciones usando el iniciador universal M13/pUC. Para la construcción del plásmido reportero luciferasa derivado del promotor de uteroglobina, el pLUGO.9 se amplificó por PCR usando el iniciador (-354/-319 pb) LUGpr-3 (5' - CTT CTG GGT GAC Aag atc tAT GCT TGC TTC TG -3') conteniendo un sitio *Bgl II* (en minúsculas) y el iniciador (+35/+7 pb) LUGpr-2 (5' - GGA AGG CTC Taa get tGC TCT GGA TCC GG-3') conteniendo el sitio *HindIII* (en minúsculas). El producto amplificado se aisló, digirió con *BglIII* y *HindIII* e insertó dentro del plásmido pGL3-Enhancer (Promega) la digestión fue con las mismas endonucleasas de restricción, resultando en el plásmido pLUGO.3/Luc conteniendo el gen de luciferasa bajo el control del fragmento promotor de 0.3 Kb de la uteroglobina. La identidad de la secuencia del promotor de la uteroglobina se confirmó por análisis de secuencias nucleotídicas. La construcción del vector de expresión del coactivador de receptores esteroideos -1 (SRC-1)-pSG5 se describió previamente [79]. El vector de expresión (CBP)-pSG5 de la proteína de unión de la proteína de unión de elementos de respuesta a AMPc se construyó del vector pCMV-2N3T-CBP [80] para clonarlo en los sitios *BamHI/BamHI* conteniendo la secuencia completa de cDNA de CBP dentro del vector pSG5. La secuencia completa de cDNA fue totalmente secuenciado, en ambos extremos y corresponde a la lectura completa de la estructura de CBP. El RE $\alpha$  humano y el vector de expresión hFSHR se describieron previamente [71,81]. El vector de expresión RE $\beta$  humano fue gentilmente donado por el Profesor Jan-Åke Gustaffson (Institute Karolinska, Suecia). El plásmido  $\beta$ -galactosidasa (pSV- $\beta$ Gal) y el vector pRL-CMV (conteniendo un cDNA de luciferasa de *Renilla*) (Promega) se usaron como controles internos de la transfección.

### **6.3. Ensayo de unión al receptor**

El ensayo de unión al receptor se realizó como se describe previamente [77]. Las células L ( $1.5 \times 10^6$ ) (derivadas de tejido adiposo y aerolar subcutáneo de ratón) expresan

de forma natural ambos receptores de estrógeno, estas se sembraron en botellas de cultivo de tejidos de 250 ml y se incubaron con Medio Dulbecco Modificado por Eagle (DMEM) sin rojo de fenol (Life Technologies, Gaithersburg, MD) y suero fetal bovino con carbón-activado. Después de 48 horas de incubación, las células fueron recolectadas por tripsinización y el extracto celular total se obtuvo después de congelar y descongelar en buffer TEGM [Tris-HCl 20 mM pH 7.4, EDTA 1 mM, molibdato de sodio 10 mM, KCl 400mM, sacarosa 350 mM y un cocktail de inhibidores de proteasas 1X (Roche, Germany)]. 50 µl del extracto celular fueron incubados en pozos por triplicado (placas de 90 pozos) con [<sup>3</sup>H] 17β-estradiol 8.0 nM y concentraciones crecientes (1 a 1000 nM) de cada compuesto no-radiomarcado: [17β-estradiol, ICI 182,780, 4-OH-tamoxifeno (TAM) y noretisterona]. La reacción se detuvo por la adición de 100 µl de una suspensión de carbón-dextran y las placas se centrifugaron a 1800 x g por 10 min. La radiactividad presente en alícuotas de 50 µl del sobrenadante se determino por espectrometría. El IC<sub>50</sub> es calculado como se describe previamente [77].

#### **6.4. Inmunocitoquímica.**

Para la determinación por Inmunocitoquímica del REα y REβ en células L, se sembraron aproximadamente  $3 \times 10^4$  células en un portaobjetos con cámaras precubiertas con fibronectina (Nunc Inc., Naperville, IL) se fijaron con paraformaldeido al 3% en PBS y los portaobjetos se incubaron con Triton X-100-PBS al 0.5 % por 5 min. La unión de inmunoglobulinas no específicas se bloqueó por incubación con albúmina sérica bovina. El portaobjetos se incubo por 2 h con el anticuerpo primario anti-REα (MC-20) o anti-REβ (Y-19) en una dilución 1:50 (4 mg/ml), como es sugerido por la compañía (Santa Cruz). Los anticuerpos Anti-RE se detectaron por incubación con IgG anti-conejo conjugada con biotina de cabra (Santa Cruz) (para la detección del REα) o IgG anti-cabra de burro (para el REβ), en una dilución 1:100, los portaobjetos se lavaron con PBS para remover el anticuerpo secundario no unido y se incubaron por 1 h a temperatura ambiente en reactivo de peroxidasa conjugada con biotina (Santa Cruz Biotechnology). El portaobjetos se

enjuagó con PBS, y se reveló con diaminobencidina (5mg/10 ml Tris 0.05 M, pH 7.6) y se tiñeron con hematoxilina de Mayer's. Las células inmuno-positivas se determinaron usando el Sistema de Imagen Metamórfico [82]. La inmunolocalización de los RE $\alpha$  y  $\beta$  es realizada por la observación de ~100 células.

Para el control negativo, se usan 2 diferentes procesos. En el primero el anticuerpo primario es omitido, y en el segundo el primer anticuerpo primario es pre-absorbido con un péptido sintético específico (RE $\alpha$ : sc-542, RE $\beta$ : sc-6821) (Santa Cruz Biotechnology).

### **6.5. Cultivo celular y transfecciones.**

En algunos experimentos, las células L-(hFSHR) y células de riñón de mono verde de África CV-1 los cuales no expresan receptores de hormonas esteroideas endogenamente [77,83] se cultivaron a 37°C en DMEM suplementado con suero fetal bovino 10%, glutamina 2 mM y 100 unidades de penicilina/estreptomicina en una atmósfera de CO<sub>2</sub> de 5%, y transfectaron transitoriamente con el vector de expresión y el reportero 3X-ERE-TATA-Luc. Los plásmidos se amplificaron en bacterias *E. coli* JM109 (Promega) y se purificaron por cromatografía de intercambio aniónico empleando el estuche de purificación de plásmidos QIAGEN ENDO-free (QIAGEN Inc., Valencia, CA, USA), siguiendo las indicaciones del fabricante. El DNA plasmídico se cuantificó por medición de la absorbancia a 260 nm y la calidad se verificó por electroforesis en geles de agarosa y se tiñeron con bromuro de etidio. El DNA plasmídico y el vector de expresión se transfectaron transitoriamente dentro de las células por transferencia de DNA mediado por liposomas. Resumiendo, las células se sembraron con una densidad inicial de 40,000 ( $4 \times 10^4$ ) células por pozo en placas de 24 pozos durante 24h a 37°C y 5 % CO<sub>2</sub>. Las células se lavaron con PBS, pH 7.4 y se transfectaron con el plásmido reportero 3X-ERE-TATA-Luc (250 ng/pozo ) y el vector de expresión (10-100 ng/pozo dependiendo de la expresión de la proteína), el vector pRL-CMV o pSV- $\beta$ Gal (5 ng/pozo) (conteniendo el cDNA de luciferas de *Renilla* o  $\beta$ -galactosidasa usados como controles internos de la transfección) o CBP (10 ng/pozo) usando lipofectamina (7.5  $\mu$ l/ml) en OPTI-MEM (Life Technologies). 24h

después de realizada la transfección, las células se trataron con medio sin rojo de fenol y libre de suero conteniendo los diferentes tratamientos [ $E_2$ , TAM, ICI182,780, FSH, activadores de PKA (8-Br-AMPC, forskolina y toxina de cólera) o inhibidores de cinasas (LY294002, H89, SB203580 y Wormanina) diluidos en etanol o DMSO respectivamente. Después del tratamiento durante toda la noche (24h), las células se recolectaron en Buffer de Lisis Pasiva 1X (Promega) y se determinó la actividad de luciferasa (Dual-Luciferase reporter assay system; Promega). La actividad de los genes reporteros 3X-ERE-TATA-Luc y el ERE-VitA-Tk-CAT se determinó directamente por la relación de la actividad de luciferasa de luciérnaga y la actividad de luciferasa de renilla o la relación de actividad de CAT o actividad de  $\beta$ -galactosidasa, respectivamente.

#### **6.6. Western blots**

El extracto celular de células L se obtuvo usando un buffer de extracción alto en sales (PLB + KCL 200mM + mezcla de inhibidores de proteasas 1X) y se centrifugó a 21,000 x g durante 5 min. a 4°C. Los extractos se mezclaron en un volumen igual de buffer conteniendo Tris-HCl 125mM (pH 6.8), SDS 4%, glicerol 20%,  $\beta$ -mercaptoetanol 2%, y azul de bromofenol 2  $\mu$ g/ml. 10 microgramos de proteína se cargaron en cada carril. La electroforesis en geles de poliacrilamida (10%) se realizó de acuerdo a Laemmli [84]. Después de la electroforesis, las proteínas se transfirieron a membranas de polivinilidina fluoruro a 250 mA, usando una transferidora celular electroforética Mini-Trans-Blot (BioRad) siguiendo el método de Towbin et al. [85]. Las membranas se bloquearon por 2 h a temperatura ambiente con leche en polvo libre de grasa al 5% (P/V) en Tris 20 mM a pH 7.6, NaCl 137 mM, Tween-20 (TBS-T) 0.1% (v/v), y se incubaron por 1 h con los anticuerpos anti-RE $\beta$  (1:2000) (Santa Cruz Biotechnology) o anti-RE $\alpha$  (1:10,000) (Active Motif, Carlsbad, CA, USA) en TBS-T. Después de la incubación con el anticuerpo primario, la membrana se lavó con TBS-T y se sumergió por 1 hora con un anticuerpo secundario conjugado con un anti-conejo silvestre peroxidasa a una dilución 1:10,000. El estudio de quimioluminiscencia del Western blotting (Amersham) se usó para observar la proteína de interés. Una proteína con carga igual se confirmó en una membrana estripeada,

lavada y probada con un anticuerpo monoclonal anti- $\beta$ -actina (1:2000) (Chemicon International, Temecula, CA; USA), una IgG anti-ratón de cabra y una peroxidasa de rábano, ambas en 10 ml de TBS-T.

### **6.7. RIA de AMPc**

Los niveles de AMPc totales (intracelular + extracelular) se determinaron por RIA después de la acetilación de las muestras y el estándar de AMPc. El RIA de AMPc se realizó empleando 2-*O*-monosuccinil AMPc tirosilmetil ester (Sigma) yodado por el método cloramina-T, y el antisuero CV-27AMPc (NIDDK's National Hormone and Pituitary Program, Torance, CA) en una dilución final de 1:75,000. Después de la incubación a 4°C por 24h, el AMPc libre y unido al anticuerpo se separó por precipitación con etanol seguidos de centrifugación a 1200 x g a 4°C. La sensibilidad del ensayo fue de 4fmol/tubo y el rango de variación y del coeficiente de ensayo tanto inter como intra fue de 9 a 11% y de 4 a 7%, respectivamente.

### **6.8 Ensayo de CAT**

Los extractos celulares se obtuvieron por congelación – descongelación y centrifugación. La concentración de proteínas se determinó por el método de BCA (Pierce Chemical Company, Rockford, IL). La actividad de CAT se determinó como se describió previamente [60,66] con modificaciones menores. En pocas palabras, el extracto celular (100  $\mu$ g) se incubó en buffer A con 5 $\mu$ l de (dicloroacetil-1-<sup>14</sup>C)-cloranfenicol y acetil-CoA (4 mM) por 1 h a 37 °C. Las formas acetiladas y no acetiladas (dicloroacetil-1-<sup>14</sup>C)-cloranfenicol se separaron por cromatografía de capa fina (TLC) en cloroformo / metanol (95:5) por 45 min. Las placas se expusieron con películas Kodak Biomax-ML (Kodak, México D.F., México) por 24 h a temperatura ambiente y las manchas radioactivas se analizaron por densitometría. Para cada ensayo, tres series de experimentos se realizaron por triplicado. La actividad  $\beta$ -galactosidasas se midió en extractos celulares usando rojo de clorofenol  $\beta$ - D-galactopiranosas como sustrato (CPRG).

### ***6.9. Ensayo de la actividad de la Luciferasa.***

La luciferasa de luciérnaga es una enzima que produce luz por la oxidación del sustrato de luciferina dependiente de ATP. En este ensayo la luciferina heterocíclica es adenilada y experimenta una descarboxilación oxidativa produciendo AMP, CO<sub>2</sub> y luz de un intermediario de la luciferina activada. La emisión de luz es máxima a 562 nm; el curso del tiempo consiste de un flash inicial dentro de los primeros segundos al añadir la luciferina, seguida por una meseta de luz que se apaga. Cuando el ensayo es registrado en presencia del exceso de sustrato, el apagado de la luz es proporcional a la concentración de enzima. El ensayo se realizó siguiendo el procedimiento descrito en el manual técnico del Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega). Se tomaron 2 µl del extracto celular, se depositaron en un tubo de ensayo de polipropileno (12 X 75 mm); se agregó 10 µl de luciferina de Luciérnaga, y se determinó la actividad luminiscente de la reacción por medio del luminómetro ( $\lambda$  visible).

### ***6.10 Ensayo de la actividad de la $\beta$ -galactosidasa***

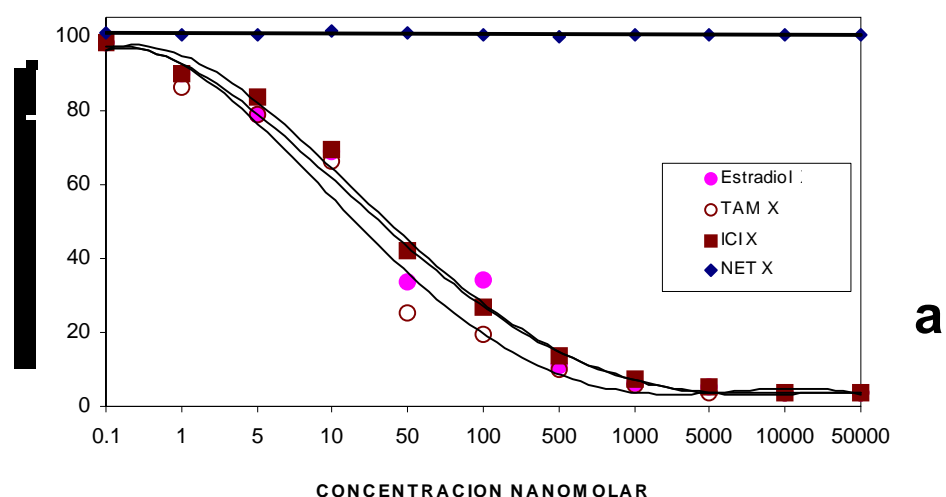
Para evaluar la eficiencia de la transfección y normalizar las lecturas de la luciferasa se cuantificó la actividad de la  $\beta$ -galactosidasa en cada extracto a través del uso de rojo de clorofenol  $\beta$ -D-galactopiranosida (CPRG) como sustrato de la enzima, se preparó una reacción estándar de 200 µl que contenía, 5 µl de extracto celular, 35 µl de amortiguador de lisis, 80 mM de amortiguador de fosfato de sodio, 102 mM de 2-mercapto-etanol (Sigma), 9 mM de MgCl<sub>2</sub> y 8 mM de CPRG (Boehringer Mannheim, Alemania) como sustrato y se incubó a 30°C durante una hora. Al término de la incubación la actividad se detectó por espectrofotometría a la longitud de onda de 560 nm.



## 7. RESULTADOS.

### 7.1 El Estradiol y la FSH inducen activación transcripcional del gen reportero 3X-ERE-TATA-Luc en células L.

Se estudio la presencia del Receptor de estrógenos en las células L. Como se aprecia en la Figura 1a, el E<sub>2</sub>, ICI 182,780 y el OH-TAM no radiomarcados compiten eficientemente con el [<sup>3</sup>H]17β-estradiol por la unión específica a los REs presentes en las preparaciones citosolicas de las células L (IC<sub>50</sub> 16 ± 0.10, 21 ± 0.13 y 15 ± 0.09, para el E<sub>2</sub>, ICI 182,780 y OH-TAM, respectivamente), mientras que las concentraciones crecientes de una progestina sintética como noretisterona; es incapaz de desplazar al [<sup>3</sup>H]17β-estradiol de los receptores. La presencia de ambos REα y REβ en células L es confirmada con un estudio inmunocitoquímico (Fig. 1b) Análisis de Western blots de extractos de proteínas de células L-(hFSHR<sup>+</sup>) expuestos a E<sub>2</sub>, FSH o FSH más E<sub>2</sub> revelan la presencia de bandas específicas correspondientes a las formas REα y β del RE (Fig. 1c). La intensidad de las bandas del REα se disminuye en extractos de células con E<sub>2</sub> pero no en células expuestas a FSH, mientras que para el REβ permanece inalterado. De forma interesante, la adición de FSH a células tratadas con E<sub>2</sub> revoca el decremento provocado por el E<sub>2</sub> en la expresión de la proteína del REα, mientras que en la banda del REβ no se detecta ningún efecto.



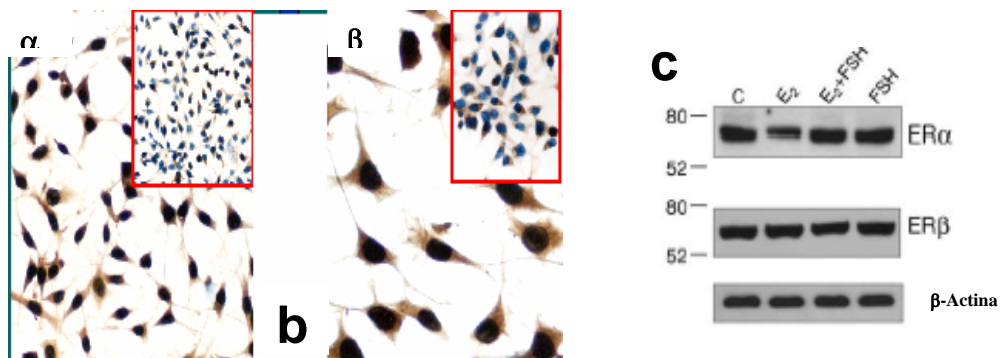


Fig.1. (a) Ensayo de unión. Competencia de los antiestrógenos [ICI182, 780 (ICI) y 4-OH-tamoxifen (OH-TAM)] y la progestina sintética noretisterona (NET) por la unión al RE<sub>2</sub>. Cantidades crecientes de cada componente son adicionadas a suspensiones citosólicas de células L-(hFSH-R<sup>-</sup>) conteniendo estradiol [<sup>3</sup>H]. Cada punto representa la media de tres experimentos separados en incubaciones por triplicado. (b) Fotomicrografía de células L-(hFSH-R<sup>-</sup>) muestran inmunidad específica por el RE $\alpha$  (amplificada 20X) y el RE $\beta$  (amplificada 40X). El recuadro representa una microfotografía de células L expuestas a un antígeno primario anti-RE $\alpha$  (MC-20) y anti-RE $\beta$  (y-19). (c) Detección de RE $\alpha$  y RE $\beta$  por Western blots en células L-(hFSHR<sup>+</sup>) expuestas a E<sub>2</sub> (10 nM), FSH (50 ng/ml) o E<sub>2</sub> + FSH.

Para determinar si la activación del R-FSH por su ligando provoca la activación transcripcional de un gen reportero sensible a estrógenos dependiente del RE, las células L se transfectaron transitoriamente con la construcción del reportero ERE-luciferasa (3X-ERE-TATA-Luc) o con ambos el DNA<sub>c</sub> R-FSH humano (hFSH-R) y el reportero 3X-ERE-TATA-Luc, y se expusieron a E<sub>2</sub> (10 nM) o FSH (50 y 100 ng/ml) por 24 hr. El tratamiento con el E<sub>2</sub> estimuló en forma significativa la actividad del reportero 3X-ERE-TATA-Luc en unas 10 veces aproximadamente tanto en la presencia o ausencia del R-FSH, comparado con el control no tratado; mientras que la FSH solo estimuló la actividad del reportero en las células que expresan transitoriamente el R-FSH (aproximadamente unas 3-4 veces comparado con el control) (Fig. 2 a). El efecto de la FSH en la transactivación del gen reportero depende de la presencia de un ERE, ya que la no transactivación es observada cuando un reportero sensible a progesterona (PRE-TATA-Luc) es transfectado (tabla 1).

Tabla 1

Transactivación de genes reporteros que albergan elementos PRE-TATA-Luc o 3X-ERE-TATA-Luc.

Tratamiento	PRE-TATA-Luc (veces de inducción)		3X-ERE-TATA-Luc (veces de inducción)	
	Células L-(hFSHR <sup>-</sup> )	Células L-(hFSHR <sup>+</sup> )	Células L-(hFSHR <sup>-</sup> )	Células L-(hFSHR <sup>+</sup> )
Control	1	1	1	1
E <sub>2</sub>	1.1 ± 0.05	0.8 ± 0.08	18.4 ± 5.30	22.3 ± 2.01
FSH	1.1 ± 0.04	1.2 ± 0.20	1.5 ± 0.10	5.2 ± 0.40
E <sub>2</sub> + FSH	1.1 ± 0.10	1.8 ± 0.15	17.2 ± 1.80	85.5 ± 10.22
FSH + ICI182, 780	1.2 ± 0.10	1.3 ± 0.02	0.8 ± 0.01	3.6 ± 0.12
ICI189, 780	0.8 ± 0.01	1.2 ± 0.60	0.7 ± 0.03	0.9 ± 0.02
FSH + H89	0.3 ± 0.01	1.0 ± 0.03	0.4 ± 0.02	1.0 ± 0.22

<sup>a</sup> Dosis empleada: E<sub>2</sub> = 10 nM; FSH = 50 ng/ml; ICI182, 780 = 1 μM; y H89 = 10 μM.

*7.2. La hormona folículo estimulante induce transactivación de genes reporteros sensibles a estrógenos en células CV1 que expresan transitoriamente el RFSH humano y REα o REβ*

Ya que la transcripción de una variedad de genes inducidos por la actividad de los REs puede ser específica del promotor o del tipo celular, y para determinar si la activación transcripcional de los REs por la FSH es un efecto específico de las células L, se realizaron transfecciones transitorias de las células CV-1 ya sea con el REα o con REβ, el DNAc del R-FSH humano y el gen reportero 3X-ERE-TATA-Luc y posteriormente fueron tratadas con E<sub>2</sub> o con FSH por 18 h. La FSH humana estimuló la actividad del reportero 3X-ERE-TATA-Luc en células que expresan cualquiera de las dos isoformas del RE (Fig.2b). Como se esperaba, la actividad del reportero de luciferasa inducido por el E<sub>2</sub> es 2 veces más alto que el producido por la FSH y un efecto aditivo de esta gonadotropina sobre la actividad del reportero inducido por el E<sub>2</sub> es observado. Así que los datos sugieren que el efecto transcripcional inducido por la FSH en las células L-(hFSH-R<sup>+</sup>) ocurre vía ambas isoformas REα y REβ así como con otros factores celulares específicos.

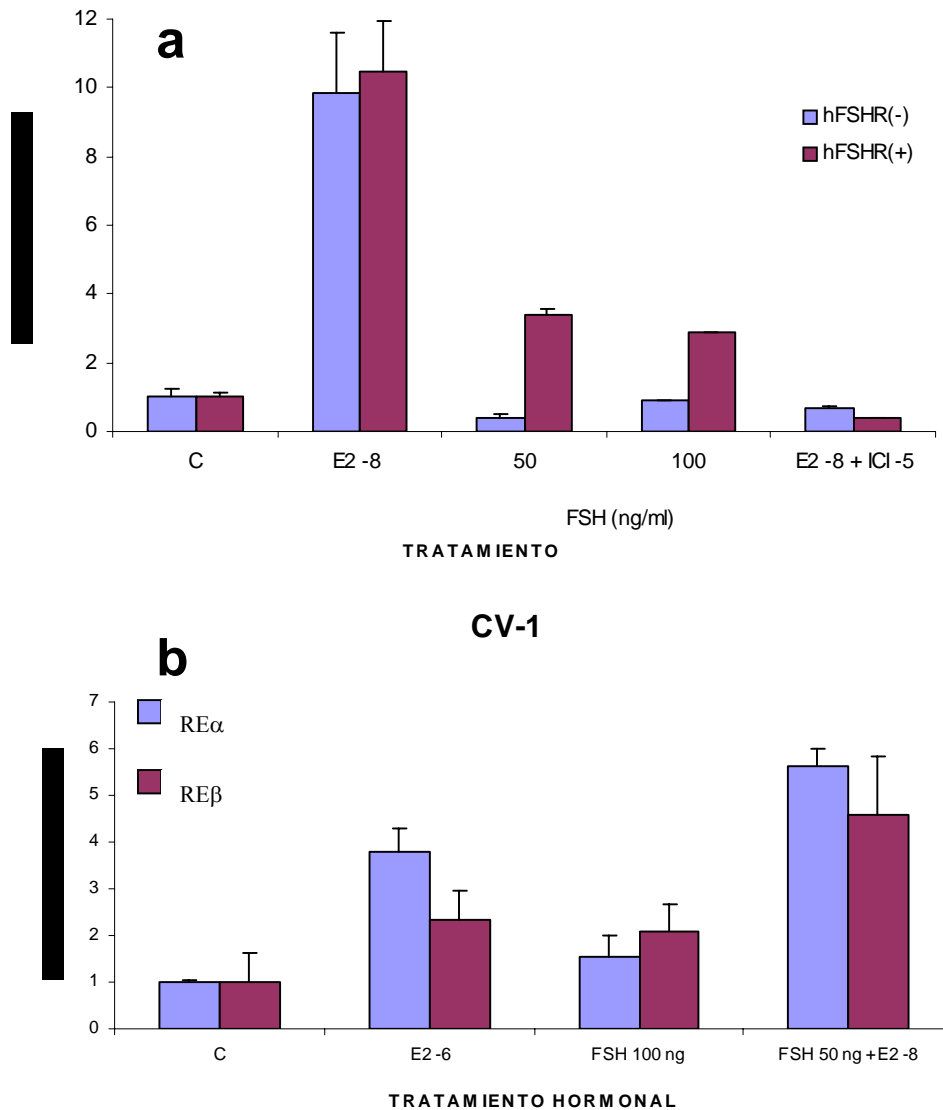


Fig.2. Activación transcripcional del reportero 3X-ERE-TATA-Luc por E<sub>2</sub> (10 nM) y FSH en células L. **(a)** Las células L son cotransfectadas transitoriamente con el gen reportero y el plásmido de expresión pSG5 hFSH-R [hFSH-R<sup>+</sup>] o el vector vacío [hFSH-R<sup>-</sup>] y tratadas con hormonas por 24h. Los datos mostrados representan la media ± D. S. de tres experimentos independientes realizados por triplicado. **(b)** Activación transcripcional del promotor 3X-ERE-TATA-Luc en células CV-1 cotransfectadas transitoriamente con el plásmido reportero, el vector del R-FSH humano y el REα o el REβ. Las células transfectadas son tratadas con E<sub>2</sub> (10 nM), FSH (50 ng/ml) o ambos por 24h. C: control (células CV-1 cotransfectadas con el plásmido reportero, el R-FSH humano; el vector de expresión REα o REβ, y tratado con el vehículo). Los datos mostrados representan la media ± D. S. de tres experimentos independientes realizados por triplicado.

Estos resultados nos dieron la pauta para analizar las vías de señalización involucradas en la transactivación mediada por FSH de genes reporteros regulados por estrógenos en células L que expresen establemente el R-FSH humano (células L-hFSH-R<sup>+</sup>) [71]. En este sistema celular, la exposición a FSH durante 5 minutos fue suficiente para estimular la actividad del 3X-ERE-TATA-Luc 24 horas después del tratamiento (Fig. 3).

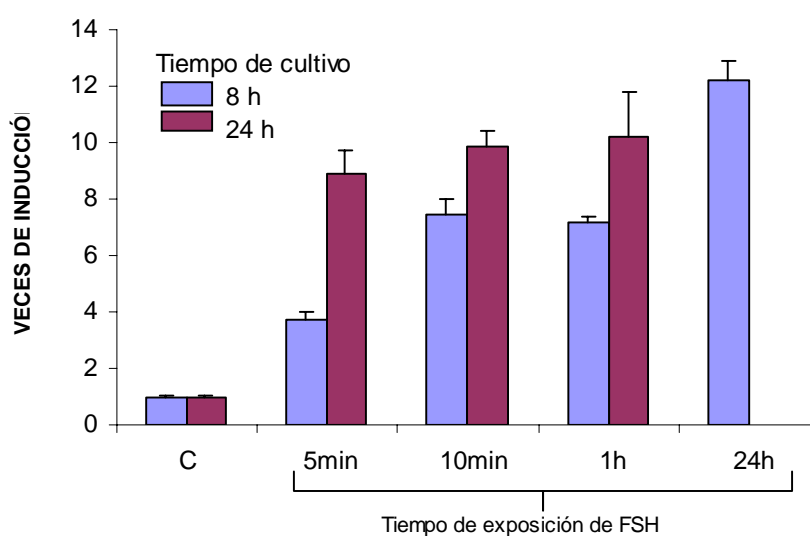


Fig.3. Efecto relacionado con el tiempo de exposición a FSH en la activación transcripcional del reportero 3XERE-TATA-Luc en células L (hFSHR<sup>+</sup>). Las células son tratadas con 50 ng/ml de FSH o con el vehículo durante 5, 10 o 60 min.; al final de cada periodo de tratamiento, las células son lavadas, se cambio el medio por limpio y se cultivaron en ausencia de FSH por 8 o 24 hr. Los datos representan la media  $\pm$  D. S. de tres experimentos independientes en incubaciones por triplicado.

En contraste al efecto aditivo observado en las células CV1, el cotratamiento con el E<sub>2</sub> y FSH en células L-(hFSH-R<sup>+</sup>), que expresan de manera endógena REs, presentan un efecto mucho mayor o sinérgico en la actividad de dos reporteros sensibles a la acción de los estrógenos, el 3X-ERE-TATA-Luc, y el ERE-VitA2-TK-CAT (Fig. 4 a, b). Debido a que las concentraciones de E<sub>2</sub> utilizadas en las células CV-1 fueron mayores (1  $\mu$ M)

además de que estas células no son blanco para estrógenos, podría sugerir que el mecanismo de activación del RE en este sistema pudiera ser diferente

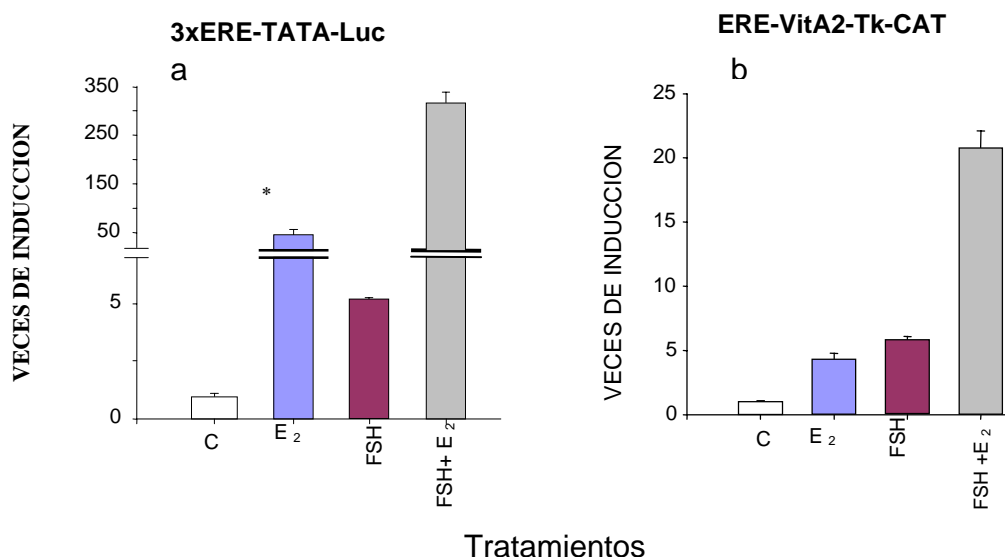


Fig. 4. Sinergismo entre E<sub>2</sub> y FSH en células L-(hFSH-R<sup>+</sup>) cotransfectadas transitoriamente con el promotor mínimo sensibles a estrógenos (3X-ERE-TATA-Luc) (a) y el gen reportero ERE-VitA2-TK-CAT (b). Las células son expuestas a las hormonas indicadas en dosis de 10nM (E<sub>2</sub>) y 50 ng/ml (FSH) durante 24 h. Hasta el fin del periodo de incubación, las células son procesadas para la determinación de la actividad de luciferasa o CAT como se describe en la sección 2. C: control tratado con vehículo. Los datos mostrados en el panel (a) son representativos de 3 o 5 experimentos independientes realizados por triplicado; mientras que los datos del panel (b) representan la media ± D. S. de tres experimentos independientes.

### 7.3. Efecto de activadores de PKA, inhibidores de cinasas y antiestrógenos, en la activación transcripcional del gen blanco sintético 3X-ERE-TATA-Luc.

Dado que las vías de transducción de señales mediadas por RFSH involucran la activación de proteínas G y múltiples cascadas de cinasas [56,62], estudiamos el efecto de diferentes activadores e inhibidores de cinasas en la transactivación del RE. La exposición de las células L-(hFSH-R<sup>+</sup>) a otros activadores de la vía G $\alpha_s$ -adenilato ciclasa-AMPC-PKA (como Toxina de cólera, forskolina y 8-Br-AMPC) estimularon la actividad del reportero 3X-ERE-TATA-Luc en una forma dependiente de la dosis (Fig. 5). En contraste el Miristato de forbol (PMA, 20 ng/ml) fue incapaz de provocar un incremento detectable en la actividad del gen reportero, con respecto al control. A la inversa, la generación de

AMPc en respuesta a la FSH y otros activadores de la vía  $G\alpha_s$ -adenilato ciclasa-AMPc-PKA fueron superiores que los provocados por el  $E_2$ , subyacente a la potencia de cada ligando para mediar las diferentes vías de señalización.

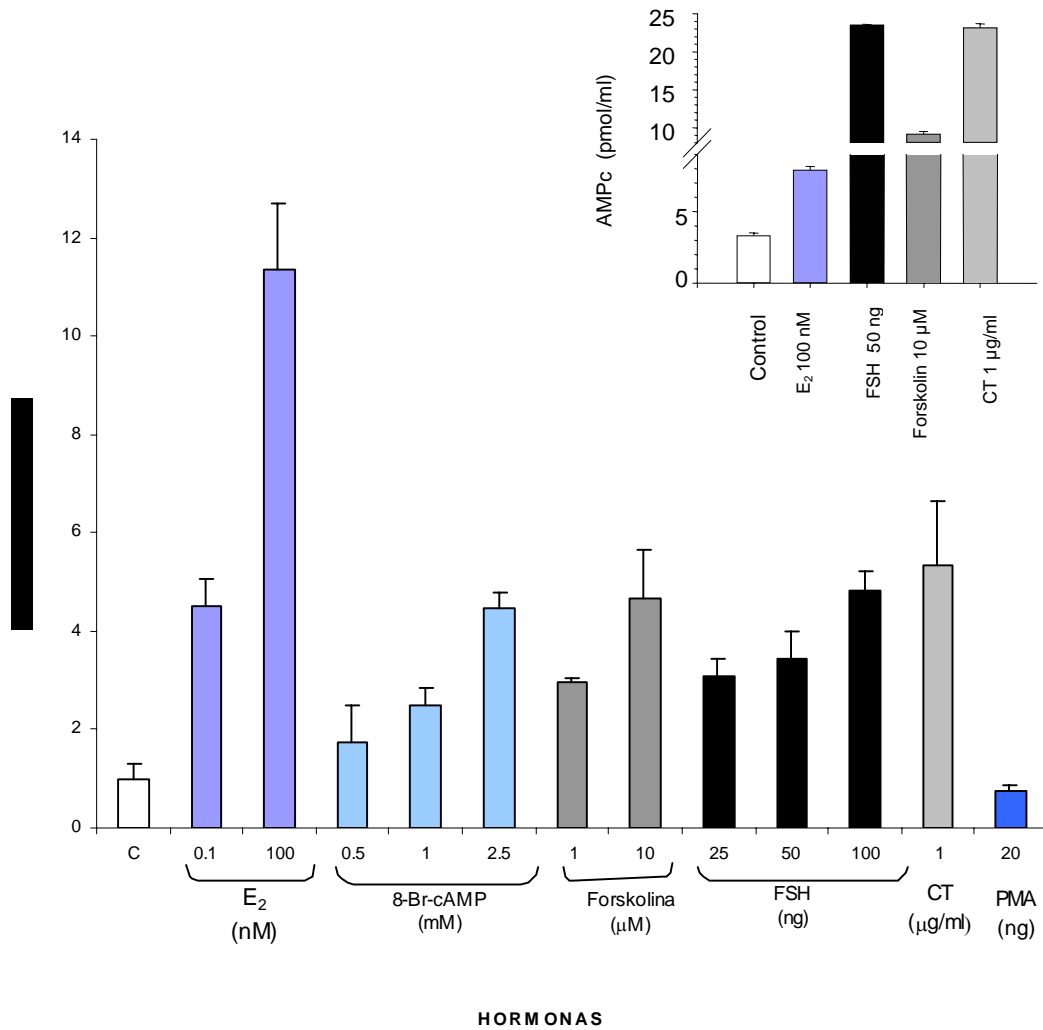
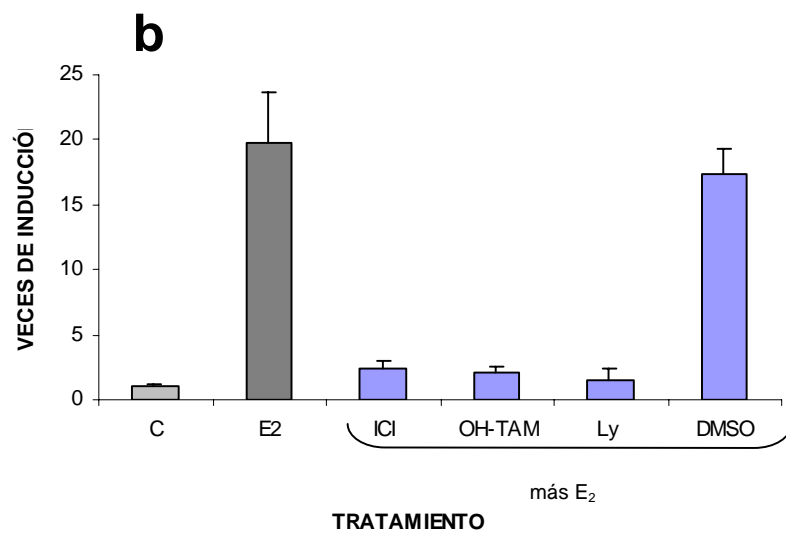
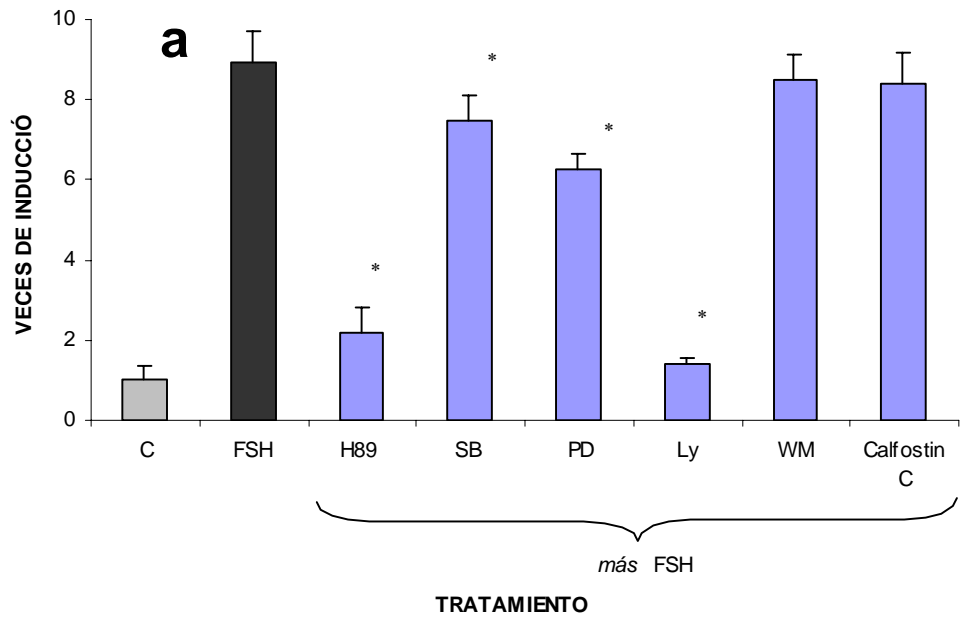


Fig. 5. Activación del reportero 3X-ERE-TATA-Luc en células L-(hFSHR<sup>+</sup>) por  $E_2$  o activadores de la cascada de señalización Gs-adenilil ciclasa-PKA (8-Br-AMPc, foscolina, toxina de cólera y FSH). Las células fueron transfectadas con el plásmido reportero como se describió y tratadas por 24h con el vehículo (control) o activadores en las dosis mostradas. Respuesta de AMPc (recuadro) de las células L-(hFSHR<sup>+</sup>) expresado por  $E_2$  o activadores de PKA. Los datos mostrados representan la media  $\pm$  D. S. de tres experimentos independientes realizados por triplicado.

Como la FSH puede activar vías de señalización diferentes, incluyendo la cascada de señalización de MAPK's y PI3-K [63-66], analizamos como la FSH afecta la transactivación de las construcciones de los reporteros sensibles a estrógenos vía PKA y/o alternando con los caminos río arriba activados por AMPc. Como se muestra en la Fig. 6a, el H89 (inhibidor de PKA) y LY294002 (inhibidor de la vía PI3-K/Akt) causaron una completa inhibición de la transactivación del reportero que contiene ERE en respuesta a FSH; mientras que el PD98059 (inhibidor de ERK 1/2) y SB203580 (inhibidor de p38MAPK) atenúan la respuesta en un ~30 y ~15 % respectivamente. Como LY294002 se une a los REs e inhibe la transactivación de los genes regulados por estrógenos (Fig. 6b) [86], la Wormanina, es usada adicionalmente para determinar como inhibidor de la vía PI3-K. Como se muestra en la Fig. 6a, este inhibidor de PI3-K es incapaz de inhibir la activación del reportero construido ERE-luciferasa en respuesta al estímulo con FSH. La Calhostina C, utilizada como inhibidor de PKC, fue de la misma manera, incapaz de bloquear la activación del reportero en respuesta a la FSH (Fig. 6a). Ninguno de los inhibidores utilizados en este estudio, excepto el LY294002, alteraron de manera significativa la transactivación del RE inducido por E<sub>2</sub>. Estos datos indican que la transactivación inducida por la FSH de genes reporteros sensibles a estrógenos directamente a través de las vías de señalización de cinasa A, utilizando en un menor grado las vías de señalización extracelular reguladas por cinasas y p38MAPK.

Es bien conocido que como resultado de la activación del RE por su ligando (estrógenos y antiestrógenos) éste sufre diversos cambios conformacionales en el dominio de unión al ligando del receptor [8,87]; Debido a que la FSH es capaz de activar al RE se determinó el efecto del antiestrógeno puro, ICI 182,780 y el modulador selectivo del receptor de estrógenos, 4-OH-tamoxifen, en la transactivación del RE inducida por FSH. Como se muestra en la Fig. 6c, ambos antiestrógenos son incapaces de inhibir el efecto de FSH en la transactivación de 3X-ERE-TATA-Luc aún en concentraciones micromolares lo que sugeriría en cierta forma que la activación de la transcripción inducida por la FSH, podría estar mediada no de manera directa por el RE, sino por algún otro mecanismo, como podrían ser los coactivadores.





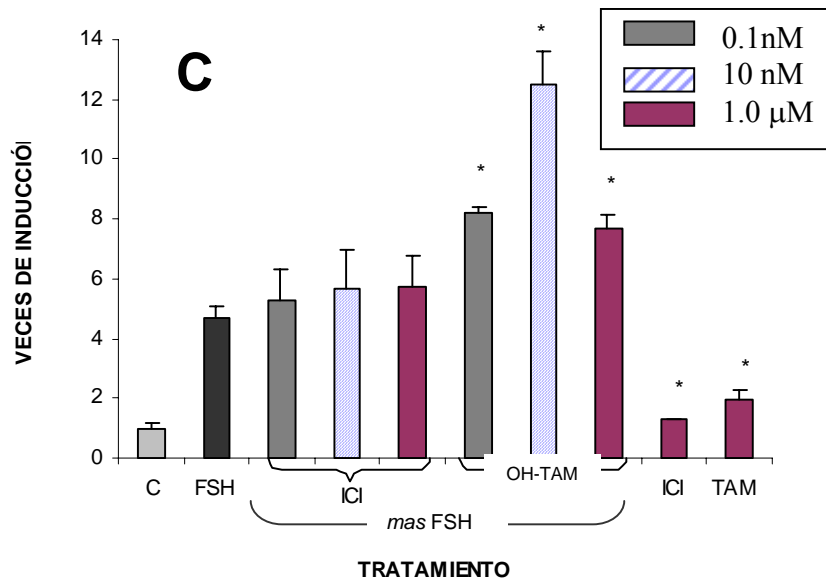


Fig.6. Activación del reportero 3X-ERE-TATA-Luc en células L-(hFSH-R<sup>+</sup>) expuestas a FSH (50 ng/ml) durante 24h. en la presencia o ausencia de inhibidores de cinasas [H89 y SB 203580 (SB), 10µM; PD98059 (PD) y LY 294002 (LY), 25 µM; Wormanina (WM), 100nM] (a) o antiestrógenos [4-OH-tamoxifen (OH-TAM) e ICI182780 (ICI)] (c). La activación del reportero después de la exposición a E<sub>2</sub> (10nM) en la ausencia o presencia de antiestrógenos es mostrada en el panel (b). Las dosis de los antiestrógenos empleados en el experimento mostrado en la gráfica (b) son de 1µM. C: el control es tratado con el vehículo. Los datos mostrados representan la media ± D. S. de tres o cinco experimentos independientes realizados por triplicado. \**p*<0.05 vs FSH.

7.4. *CBP aumenta la transactivación estimulada por FSH de un gen reportero sensible a estrógenos.*

Puesto que la activación del RE controla la transcripción de genes específicos a través del reclutamiento de numerosos coactivadores que se expresan en las células de manera específica [9,10,88,89], estudiamos la participación de dos de los principales coactivadores del RE, el coactivador p160 SRC-1 así como el coactivador general / cointegrador, CBP. Estos coactivadores fueron cotransfectados en células L (hFSH-R<sup>+</sup>) junto con los reporteros y se analizó la respuesta en transactivación al estímulo con FSH. Como se muestra en la Fig.7, la sobre expresión de CBP aumenta de 2 a 4 veces la actividad transcripcional provocada por FSH no sucediendo así con el coactivador SRC-1.

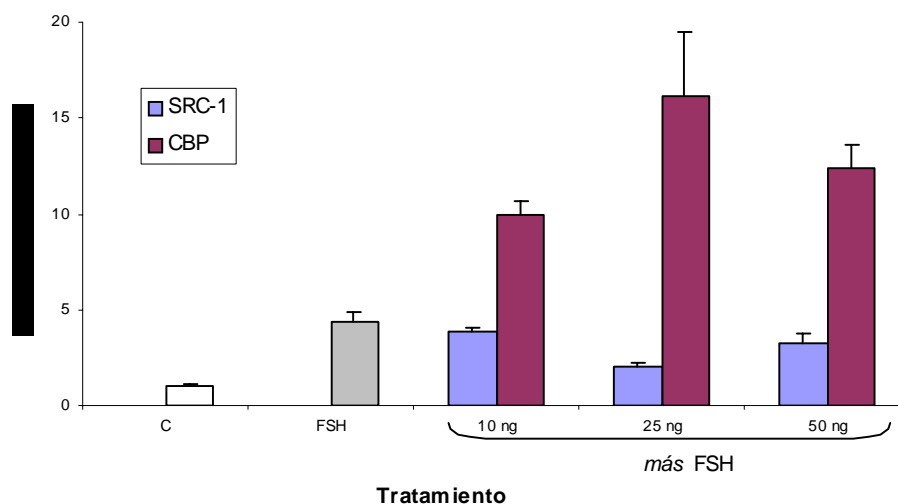


Fig. 7. Efecto de la sobre expresión de los coactivadores SRC-1 y CBP en la activación transcripcional de genes reporteros regulados por estrógenos. Las células L-(hFSH-R<sup>+</sup>) son cotransfectadas con el plásmido reportero 3X-ERE-TATA-Luc y cantidades variables de vectores de expresión SRC-1 o CBP, y expuestas a 50 ng/ml de FSH por 24 h. CBP pero no SRC-1 incrementan la activación inducida por FSH en todas las concentraciones estudiadas. Los datos representan la media  $\pm$  D. S. de tres experimentos independientes en incubaciones por triplicado.

*7.5. La estimulación de la expresión de genes dependientes del RE por la FSH ocurre en el contexto de varios promotores que contienen ERE.*

Se sabe que la activación transcripcional de genes sensibles a  $E_2$  esta regulada de una manera importante por el contexto de su promotor, en el cual de manera general se localizan los ERE junto con muchos otros elementos mas, que en conjunto modularán la actividad transcripcional de dicho promotor [11,15]. Para analizar la influencia del promotor en la activación transcripcional inducida por la FSH, utilizamos 3 reporteros diferentes cuyos promotores poseen diferentes secuencias de bases además del (los) EREs. Utilizamos un promotor sintético basado en la secuencia repetida de 3 EREs unidos a la caja TATA y al gen de la luciferasa de luciérnaga (3X-ERE-TATA-Luc), otro fue el ERE-VitA2-TK-CAT que contiene la secuencia intacta del ERE del gen de la Vitelogenina A2, unido al promotor de la timidina cinasa, y por ultimo utilizamos como promotor natural (no alterado) al promotor de la uteroglobina de la liebre, cuya transcripción esta regulada por el RE (pLUGO.3/Luc). Estos vectores reporteros fueron transfectados en las células L-(hFSH-R<sup>+</sup>) y estimulados con FSH y/o  $E_2$  en la presencia o ausencia de los diferentes inhibidores (de cinasas y antiestrógenos). Ambos promotores el ERE-VitA2-TK-CAT y el pLUGO.3/Luc responden a FSH y  $E_2$ , aunque a un diferente nivel. La transactivación del reportero ERE-VitA2-TK-CAT inducida por FSH es un 70 % parecida al provocado por  $E_2$ , dependiendo de la sobre-expresión de CBP (Fig.8a); con este promotor las veces de inducción son mas bajas en la presencia de altas dosis de ambos antiestrógenos. La transactivación del promotor natural de uteroglobina conteniendo ERE solo es inducida por FSH, aunque en menor alcance que para  $E_2$  y no se observa un efecto sinérgico entre FSH y  $E_2$ ; así como tampoco tiene efecto inhibitorio el antiestrógeno (Fig. 8c). La transactivación del promotor sintético 3X-ERE-TATA-Luc es inducida por FSH aunque en menor grado que para  $E_2$  dependiendo de la sobre expresión de CBP (Fig.8b), así como tampoco tienen un efecto inhibitorio los antiestrógenos. De esta forma, se explica por que la transactivación estimulada por FSH de genes sensibles a estrógenos ocurre en un contexto dependiente del promotor.

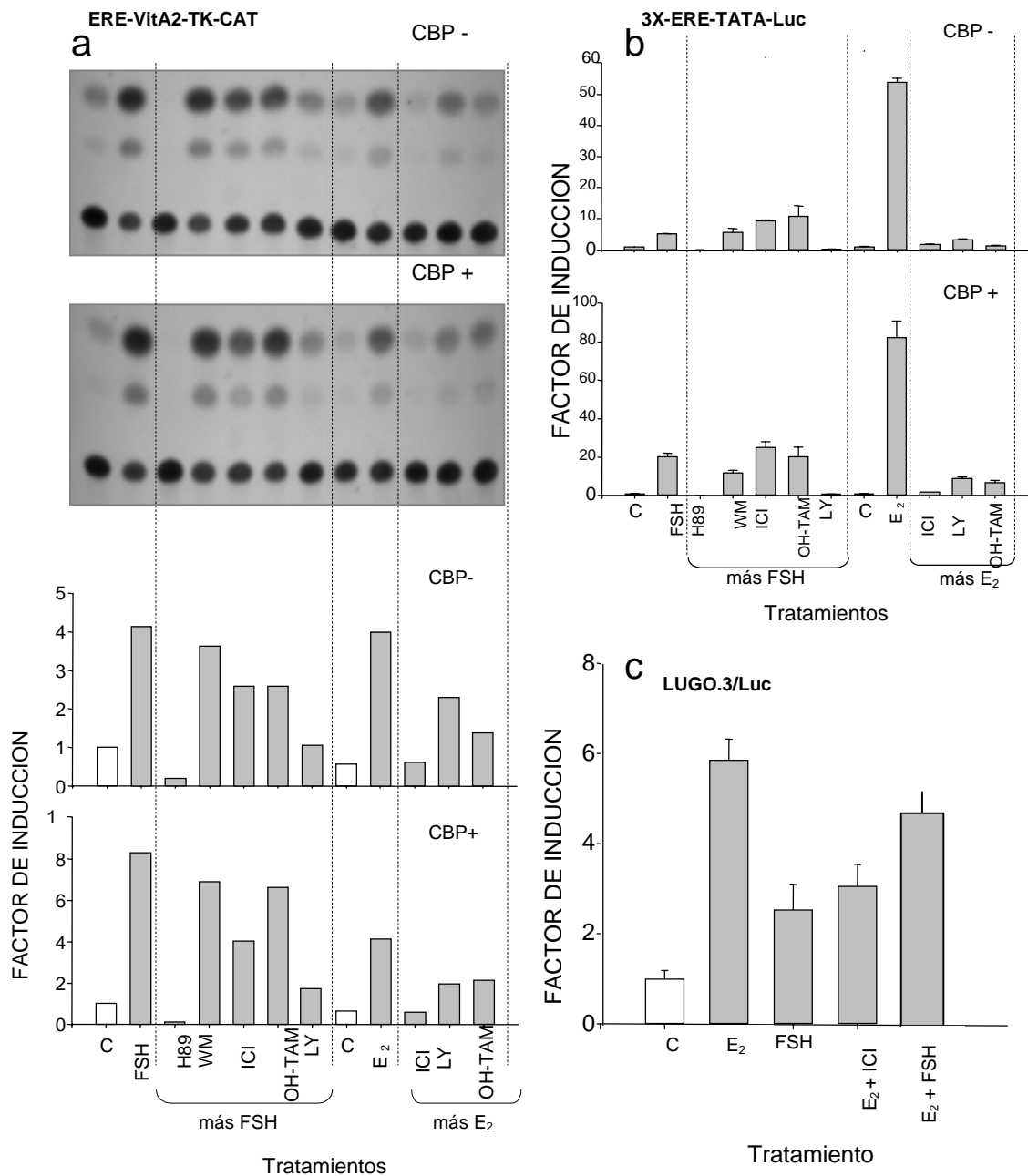


Fig. 8. Efecto de E<sub>2</sub> y FSH en la activación transcripcional de diferentes promotores (ERE-VitA2-TK-CAT, 3X-ERE-TATA-Luc y LUGO.3/Luc). Las células L-(hFSH-R<sup>+</sup>) son cotransfectadas con los genes reporteros ERE-VitA2-TK-CAT (**a**) y el 3X-ERE-TATA-Luc (**b**) o el promotor sensible a E<sub>2</sub> (**c**), y tratados por 24 h. con FSH (50 ng/ml) o E<sub>2</sub> (10 nM) en la ausencia o presencia de inhibidores de cinasas (en las dosis descritas en la leyenda de la Fig. 6.) o antiestrógenos (1 μM). CBP<sup>+</sup>: sobre expresión de CBP (transfectados 40 ng/ml de pSG5-CBP); CBP<sup>-</sup>: no sobreexpresión de CBP. Los datos mostrados en (a) (panel de abajo) y en (b) son representativos de 3 experimentos independientes realizados por triplicado; la autorradiografía en (a) (panel superior) deriva de una sola replica del experimento mostrado en el panel inferior. Los datos en (c) representan la media ± D. S. de tres experimentos independientes por triplicado.

## 8. DISCUSION

En el presente estudio, demostramos primeramente que las células L expresan de manera endógena ambos subtipos de RE $\alpha$  y  $\beta$  además de poseer la maquinaria transcripcional requerida para responder al estímulo con estrógenos. Por otra parte también demostramos que las células L son capaces de responder a incrementos en el AMPc intracelular provocado por proteínas G<sub>s</sub> exógenas y activar a la adenilato ciclasa, la cual estimulan la transcripción de genes reporteros sensibles a estrógenos en la ausencia de hormonas exógenas, lo cual las hace un modelo adecuado para nuestros estudios. El tratamiento con PMA fue incapaz de producir la activación transcripcional de promotores conteniendo ERE en estas células, y aunque este éster de forbol puede activar al RE en otros sistemas celulares [90,51], en esta línea en particular podría sugerir que la activación del RE por PKC juega un papel menor en la transcripción dependiente de RE en la ausencia de E<sub>2</sub>. Estos resultados son particularmente importantes para nuestro estudio ya que: (i) En altas dosis, la FSH activa a los promotores del sistema de señalización de la fosfolipasa C $\beta$  - inositol fosfato-PKC [91]; (ii) La PKC puede fosforilar potencialmente al RE usando la vía MAPK [29,48,992]; y (iii) El éster de forbol bloquea la fosforilación de Akt/pKB [93], una cinasa que sólo provoca fosforilación del RE $\alpha$  [30].

En las células L-(hFSHR<sup>+</sup>) expuestas a FSH pituitaria humana, la activación transcripcional de genes reporteros sensibles regulados por estrógenos es inhibida por el tratamiento con el inhibidor específico de la PKA, H89. Este resultado sugiere que en este sistema celular la gonadotropina primaria actúa a través de la vía PKA para producir un efecto parecido al de estrógenos. Sin embargo la activación del RE provocada por FSH también fue atenuada por un inhibidor de una cascada de señalización distinta de MAPK, específicamente la cascada ERK 1-2. Es conocido que esta vía alternativa de señalización puede ser activada por AMPc a través de distintas señales efectoras de señalización río abajo incluyendo PKA y factores que intercambian nucleótidos de guanina (GEFs) sensibles a AMPc, los cuales funcionan como factores que intercambian a pequeñas GTPasas (Rap 1/2 y Ras) que conectan con la vía ERK 1/2 y p38MAPK a través de la activación de las cinasas Raf-1, B-Raf o c-Raf [56,62]. Aunque la transactivación inducida

por FSH de genes sensibles a estrógenos es bloqueado completamente por H89, lo cual es consistente con la vía AMPc-PKA implicada en este proceso, algunos estudios han detectado que este inhibidor de cinasas solo puede influir en la actividad de p38MAPK [65]. Simultáneamente estos datos sugieren que ambas vías AMPc-PKA y AMPc-GEFs pueden converger para mediar el efecto tipo estrogénico en células L. Por otro lado, la interacción AMPc-GEFs puede potencialmente activar la vía de la PI3-K/PKD/Akt [62,64], y dirigir las a la fosforilación del RE. El hecho de que la Wormanina fuera incapaz de alterar significativamente la activación transcripcional estimulada por FSH y E<sub>2</sub>, le resta importancia a esta vía en la activación transcripcional de RE mediada por FSH en las células L-(hFSHR<sup>+</sup>). En conjunto, los resultados indican que la FSH estimula predominantemente la activación transcripcional de genes reporteros sensibles a estrógenos en una manera dependiente de PKA en células L-(hFSHR<sup>+</sup>), usando también, aunque en menor grado, la cascada MAPK (ERK 1/2).

El cotratamiento con FSH y E<sub>2</sub> nos indica que existe un efecto sinérgico en las células L-(hFSHR<sup>+</sup>) cotransfectadas con los genes reporteros 3X-ERE-TATA-Luc o el ERE-VitA2-TK-CAT además de la estimulación de la proliferación celular provocada por E<sub>2</sub>, aunque en un menor grado. Un mecanismo por el cual la FSH puede aumentar la activación del RE inducida por E<sub>2</sub> es manteniendo la estabilidad del RE activado transcripcionalmente [16]. En efecto, evidencias derivadas de diferentes laboratorios han demostrado que los estrógenos inducen una degradación rápida de sus receptores por los proteosomas, esto limita la respuesta transcripcional inducida por el ligando y reconoce a la ciclina del RE (Fig. 1C), por otra parte la estimulación de la transcripción del RE $\alpha$  por la vía dependiente PKA estabilizaría al receptor para la degradación y actividad proteosómica [46,94-97]. Por otra parte, es bien conocido que las proteínas CREB activadas por AMPc son reclutadas por los genes sensibles a estrógenos cerca de los complejos coactivador-RE conteniendo a CBP, en una interacción que estabiliza al complejo RE-CBP y promueve el sinergismo transcripcional entre el RE activado y la PKA, incluso en la ausencia de elementos sensibles a AMPc [98]. Un mecanismo similar en la estabilidad del RE podría

explicar la ineficiencia de los antiestrógenos para bloquear el efecto de tipo estrogénico de la FSH.

El hecho de que las dosis bajas de 4-OH-tamoxifen potencia el efecto de FSH en la activación transcripcional del reportero 3X-ERE-TATA-Luc, sugiere fuertemente que los cambios conformacionales del RE provocados por el tamoxifen, junto con la activación de la PKA favorecen el reclutamiento de proteínas coactivadoras que resulta en una elevada actividad de luciferasa, resultado de la activación transcripcional del ERE.

Otros estudios han demostrado que el efecto de los antiestrógenos en la activación independiente del ligando en los RE difiere dependiendo de la clase particular de compuestos estudiados. Por ejemplo, el antiestrógeno puro ICI182, 780 o ICI164, 384 inhiben la acción mediada por AMPc en algunos genes reporteros sensibles a estrógenos [28,46] mientras que el 4-OH-Tamoxifen es incapaz para bloquear la transactivación de la transcripción de genes dependientes del RE estimulados por dopamina [28]. Por otra parte se ha documentado que los activadores de PKA pueden conferir actividad agonista al tamoxifen en células en las cuales este compuesto se comporta como un antagonista puro [99]. De esta manera, las diferencias en respuesta a antiestrógenos pueden surgir alternativamente de la heterogeneidad del sistema celular empleado, incluyendo la presencia relativa de los RE $\alpha$  y RE $\beta$  endógenos, el tiempo de exposición a los antiestrógenos, y el factor específico que regula la función de cada isoforma del receptor [12,27,53,100-102]. Cualquiera que fuera el mecanismo involucrado, Estos resultados sugieren fuertemente que la estimulación de la actividad del gen reportero por la gonadotropina es de hecho un efecto mediado por FSH.

Basado en el estudio de la sobre expresión de CBP, proponemos que el efecto sinérgico y/o estimulador de FSH en la activación transcripcional de genes sensibles a estrógenos y la proliferación celular son mediados por la modificación de proteínas coactivadoras, las cuales sucesivamente pueden contribuir a la activación del RE dependiente de AMPc. Entre estas proteínas correguladoras esta CBP la cual es un blanco río abajo de la vía de señalización de AMPc [9,10,33,103,104] y su interacción con el RE activado es estimulada por el reclutamiento de CREB activado por PKA o por el complejo coactivador-RE [105]. Por otra parte, SRC-1, el cual actúa sinérgicamente con CBP para



activar la transcripción de promotores regulados por el RE, solo contribuyen a la activación inducida por PKA de ambos el RE $\alpha$  y el RE $\beta$  [93]. Sin embargo, este coactivador puede no ser fosforilado directamente por PKA sino más bien por MAPK, mientras que CBP puede ser fosforilada por ambas PKA y MAPKs en una forma no cooperativa [106-109]. En el presente estudio, observamos que la sobre expresión de CBP, pero no SRC-1, aumenta la activación transcripcional de genes sensibles a estrógenos en las células L-(hFSHR<sup>+</sup>). Estos resultados sugieren la posibilidad de que ocurra una fosforilación dependiente de PKA de un número mayor de proteínas, incluyendo CREB y CBP [98], que resultan en la activación transcripcional sinérgica provocada por FSH. En esta posición, los cambios conformacionales provocados por la fosforilación de estos u otros factores de transcripción pueden llevar a la formación de interacciones de superficie que favorecen las interacciones proteína-proteína, eventualmente conduciendo a un aumento en la activación de la transcripción.

Considerando que los cambios estructurales inducidos por ERE o él ligando son determinadamente independientes del reclutamiento de coactivadores y la respuesta transcripcional [87], estudiamos el efecto transcripcional inducido por FSH en diferentes contextos promotores. En todos los sistemas estudiados, la FSH activa a los promotores encubiertos de ERE. Sin embargo, el alcance de la activación varía dependiendo del contexto promotor. La activación transcripcional del reportero ERE-VitA2-TK-CAT inducida por FSH es similar o incluso superior (cuando CBP es sobre expresado) que la inducida por E<sub>2</sub>, mientras que ocurre lo contrario para el promotor mínimo (3X-ERE-TATA-Luc). Esto puede ser debido a la presencia de diferentes elementos en cis que, en adición a los EREs, pueden participar potencialmente en la regulación transcripcional de los genes reporteros, incluyendo los elementos sensibles a AMPc (CRE) y elementos SP1, ambos presentes en el promotor TK [110]. En adición a los promotores sintéticos, sólo estudiamos el efecto parecido a estrógenos de la FSH en un promotor regulado naturalmente por estrógenos, el promotor de uteroglobina. En este contexto promotor en particular, la FSH efectivamente provoca la activación de la transcripción, aunque en un menor alcance que en su contraparte sintética y no muestra un efecto sinérgico o aditivo con el E<sub>2</sub>. De esta manera, la acción de la FSH solo puede impactar a los promotores

encubiertos de ERE en los cuales una regulación sincronizada y más precisa de la maquinaria transcripcional está presente.

Los datos presentados aquí sugieren ampliamente que la transactivación de los promotores conteniendo ERE por la FSH representa un sitio potencial para la integración de dos diferentes vías de transducción de señales que pueden modular adicionalmente el crecimiento, proliferación y diferenciación celular en el ovario y de esta forma jugar un papel importante en condiciones *in vivo* [56,68]. Por ejemplo, en pequeños folículos en crecimiento, la FSH puede impactar la proliferación celular a través de este efecto parecido a estrógenos, o en folículos en los cuales la expresión de la aromatasa CYP19 es todavía ausente y por consiguiente la síntesis de estrógenos es limitada [56,111]. Este efecto puede ser ejercido por cualquiera de las 2 vías de entrecruzamiento entre las diversas cascadas de señalización celular activadas por FSH y los REs [44,81] o selectivamente a través de las vías exclusivamente activadas por la vía AMPc-PKA [62,112], ambas independientes de la presencia de E<sub>2</sub>. En estados más avanzados del desarrollo folicular, los efectos del E<sub>2</sub> en la función de las células de la granulosa puede ser amplificado por FSH a través de la activación transcripcional de genes sensibles a estrógenos seguido del reclutamiento de la proteína coactivadora CBP, la cual en turno puede interactuar por si misma con una variedad de proteínas reguladoras, incluyendo factores de transcripción general [113]. Por otro lado, ha sido bien demostrado que la FSH estimula el crecimiento de células epiteliales de superficie ováricas normales, preneoplásicas y neoplásicas que expresan el RFSH en una manera dependiente de MAPK [72,73]. Por los datos presentados aquí, es concebible que en condiciones *in vivo* la FSH pueda ejercer efectos mitogénicos en estos y en otros tipos celulares (e.g. células de la granulosa) [114] a través de la activación de genes regulados por el RE, de este modo promueven el desarrollo de tumores ováricos. Aunque el sistema empleado de células L-(hFSHR<sup>+</sup>) en el presente estudio representa un modelo interesante para estudiar las interacciones entre las cascadas de señalización intracelular activadas por FSH y el RE; se realizaron estudios adicionales empleando células blanco naturales para ambos FSH y estrógenos son necesarias para definir más precisamente la importancia de esta gonadotropina en la activación transcripcional de genes sensibles a estrógenos y el efecto sinérgico de FSH en la acción mediada por E<sub>2</sub>.

## 9. CONCLUSIONES

- La FSH activa endogenamente al RE en las células L-(hFSHR<sup>+</sup>) y resulta en una actividad sinérgica significativa en la actividad transcripcional inducida por E<sub>2</sub> de diferentes genes reporteros sensibles a estrógenos.
- El efecto de la FSH en los REs involucra el camino de señalización de AMPc/PKA y en un menor grado el camino mediado por MAPK; pero no la vía PI3-K/Akt
- La sobre expresión de CBP, pero no SRC-1, aumenta la transactivación inducida por FSH de genes sensibles a estrógenos

## **BIBLIOGRAFIA**

- [1] R. Gore-Langton, D.T. Armstrong. Follicular steroidogenesis and its control. En Knobil E, Neill JD. eds. *The Physiology of Reproduction*. 2nd ed, Vol. 1 New York Raven:Raven. (1994); 571-628.
- [2] S. Green, P. Walter, V. Kumar, A. Krust, J.M. Bornert, P. Argos, P. Chambon. Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. *Nature*. (1986); 320: 134-139.
- [3] G.G. Kuiper, E. Enmark, M. Peltö-Huikko, S. Nilsson, J. Gustafsson. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (1996); 93: 5925-5930.
- [4] M. Beato, P. Herrlich, G. Schutz, Steroid hormone receptors: many actors in search of a plot, *Cell*. (1995); 83:851–857.
- [5] L. Tora, J. White, C. Brou, D. Tasset, N. Webster, E. Scheer, P. Chambon, The human estrogen receptor has two independent nonacidic transcriptional activation functions, *Cell*. (1989); 59:477–487.
- [6] P. Pace, J. Taylor, S. Suntharalingam, R.C. Coombes, S. Ali, Human estrogen receptor beta binds DNA in a manner similar to and dimerizes with estrogen receptor alpha, *J. Biol. Chem.* (1997); 272:25832–25838.
- [7] B.S. Katzenellenbogen, I. Choi, R. Delage-Mourroux, T.R. Ediger, P.G. Martini, M. Montano, J. Sun, K. Weis, J.A. Katzenellenbogen, Molecular mechanisms of estrogen action: selective ligands and receptor pharmacology, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* (2000); 74:279–285.

- [8] B.S. Katzenellenbogen, J. Sun, W.R. Harrington, D.M. Kraichely, D. Ganessunker, J.A. Katzenellenbogen, Structure-function relationships in estrogen receptors and the characterization of novel selective estrogen receptor modulators with unique pharmacological profiles, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* (2001); 949:6–15.
- [9] N.J. McKenna, B.W. O'Malley, Nuclear receptor coactivators—an update, *Endocrinology* (2002), 143:2461–2465.
- [10] O. Hermanson, C.K. Glass, M.G. Rosenfeld, Nuclear receptor coregulators: multiple modes of modification, *Trends Endocrinol. Metab.* (2002); 13:55–60.
- [11] M.T. Tzukerman, A. Esty, D. Santiso-Mere, P. Danielian, M.G. Parker, R.B. Stein, J.W. Pike, and D.P. McDonnell. Human estrogen receptor transactivational capacity is determined by both cellular and promoter context and mediated by two functionally distinct intramolecular region. *Mol. Endocrinol.* (1994); 8:21-30.
- [12] S.M. Cowley, S. Hoare, S. Mosselman, M.G. Parker. Estrogen receptors alpha and beta form heterodimers on DNA. *J. Biol. Chem.* (1997); 272:19858-19862.
- [13] L.A. Paige, D.J. Christensen, H. Gron, J.D. Norris, E.B. Gottlin, K.M. Padilla, C.Y. Chang, L.M. Ballas, P.T. Hamilton, D.P. McDonnell, D.M. Fowlkes. Estrogen receptor (ER) modulators each induce distinct conformational changes in ER alpha and ER beta. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (1999); 96: 3999-4004.
- [14] M.J. Tsai and B.W. O'Malley. Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annu. Rev. Biochem.* (1994); 63: 451-486.
- [15] D.P. McDonnell, J.D. Norris, Connections and regulation of the human estrogen receptor, *Science.* (2002); 296:1642–1644.

- [16] J.M. Hall, D.P. McDonnell. The estrogen receptor beta-isoform (ERbeta) of the human estrogen receptor modulates ERalpha transcriptional activity and is a key regulator of the cellular response to estrogens and antiestrogens. *Endocrinology*. (1999); 140: 5566-5578.
- [17] J.M. Hall, D.P. McDonnell & K.S. Korach. Allosteric regulation of estrogen receptor structure, function, and coactivator recruitment by different estrogen response elements. *Molecular Endocrinology*. (2002);16:469–486.
- [18] C.M. Klinge. Estrogen receptor interaction with estrogen response elements. *Nucleic Acids Research*. (2001); 29:2905–2919.
- [19] P.C. Kulakosky, S.C. Jernigan, M.A. McCarty & C.M. Klinge. Response element sequence regulates estrogen receptor alpha and beta affinity and activity. *Journal of Molecular Endocrinology*. (2002); 29:137–152.
- [20] T.L. Ramsey & C.M. Klinge. Estrogen response element binding induces alterations in estrogen receptor  $\alpha$  conformation as revealed by susceptibility to partial proteolysis. *Journal of Molecular Endocrinology*. (2001); 27:275–292.
- [21] V.V. Tyulmenkov & C.M. Klinge. Estrogen receptors alpha and beta exhibit different estradiol and estrogen response element binding in the presence of nonspecific DNA. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. (2001a); 390:253–264.
- [22] V.V. Tyulmenkov & C.M. Klinge. A mathematical approach to predict the affinity of estrogen receptors alpha and beta binding to DNA. *Molecular and Cellular Endocrinology*. (2001b); 182:109–119.
- [23] C.M. Klinge, S.C. Jernigan, K.A. Mattingly, K.E. Rigingr and J. Zhang. Estrogen response element-dependent regulation of transcriptional activation of estrogen receptor  $\alpha$

and  $\beta$  by coactivators and corepressors, *Journal of Molecular Endocrinology*. (2004); 33:387-410.

[24] V.T. Tyulmenkov, S.C. Jernigan and C.M. Kingle. Comparison of transcriptional synergy of estrogen receptor alpha and beta from multiple tandem estrogen response elements. *Mol. Cell. Endocrinol*, (2000); 165:151-161.

[25] V.T. Tyulmenkov and C.M. Kingle. Selectivity of detection of estrogen receptor  $\alpha$  and  $\beta$  with cognate antibodies in electrophoretic mobility shift assay . *Steroids*. (2000), 65:505-512.

[26] C.M. Kingle, K. Kaur and H.I. Swason. The aryl hydrocarbon receptor interacts with estrogen receptor alpha and orphan receptor COUP-TF1 and  $ERR\alpha 1$ . *Arch. Biochem. Biophys*. (2000); 373:163-174.

[27] F. Delaunay, K. Pettersson, M. Tujague, J.A. Gustafsson, Functional differences between the amino-terminal domains of estrogen receptors alpha and beta, *Mol. Pharmacol*. (2000); 58:584–590.

[28] C.L. Smith, O.M. Conneely, B.W. O'Malley, Modulation of the ligand-independent activation of the human estrogen receptor by hormone and antihormone, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (1993); 90:6120–6124.

[29] N.L. Weigel, Y. Zhang, Ligand-independent activation of steroid hormone receptors, *J. Mol. Med.* (1998); 76:469–479.

[30] G. Bunone, P.A. Briand, R.J. Miksicek, D. Picard. Activation of the unliganded estrogen receptor by EGF involves the MAP kinase pathway and direct phosphorylation. *EMBO J.* (1996); 15:2174-2183.

- [31] D.M. Ignar-Trowbridge, C.T. Teng, K.A. Ross, M.G. Parker, K.S. Korach, J.A. McLachlan, Peptide growth factors elicit estrogen receptor-dependent transcriptional activation of an estrogenresponsive element, *Mol. Endocrinol.* (1993); 7:992–998.
- [32] S. Kato, H. Endoh, Y. Masuhiro, T. Kitamoto, S. Uchiyama, H. Sasaki, S. Masushige, Y. Gotoh, E. Nishida, H. Kawashima, D. Metzger, P. Chambon, Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase, *Science.* (1995); 270:1491–1494.
- [33] A. Tremblay, V. Giguere, Contribution of steroid receptor coactivator-1 and CREB binding protein in ligand-independent activity of estrogen receptor beta, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* (2001); 77:19–27.
- [34] A. Tremblay, G.B. Tremblay, F. Labrie, V. Giguere. Ligand-independent recruitment of SRC-1 to estrogen receptor  $\beta$  through phosphorylation of activation function AF-1. *Mol. Cell.* (1999); 3: 513-519.
- [35] S.W. Curtis, T. Washburn, C. Sewall, R. DiAugustine, J. Lindzey, J.F. Couse, K.S. Korach. Physiological coupling of growth factor and steroid receptor signaling pathways: estrogen receptor knockout mice lack estrogen-like response to epidermal growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* (1996); 93:12626.
- [36] R.F. Power, S.K. Mani, J. Codina, O.M. Conneely, B.W. O'Malley. Dopaminergic and ligand-independent activation of steroid hormone receptors. *Science.* (1991); 254:1636-1639.
- [37] F. Demay, M. De Monti, C. Tiffocche, C. Vaillant, M.L. Thieulant, Steroid-independent activation of ER by GnRH in gonadotrope pituitary cells, *Endocrinology.* (2001); 142:3340–3347.



- [38] C. Gründker, L. Schlotawa, V. Viereck, N. Eicke, A. Horst, B. Kairies & G. Emons. The antiproliferative effects of GnRH antagonist cetrorelix and of GnRH-II on human endometrial and ovarian cancer cells are not mediated through the GnRH type I (GnRH-I) receptor. *European Journal of Endocrinology*. (2004); 151:141–149.
- [39] S.K. Kang, K.C. Choi, C.J. Tai, N. Auersperg & P.C.K. Leung. Estradiol regulates gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and its receptor gene expression and antagonizes growth inhibitory effects of GnRH in human ovarian surface epithelial and ovarian cancer cells. *Endocrinology*. (2001) 142: 580–588.
- [40] C. Gründker, A.R. Grünther, M. Hellriegel and E. Günter. Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) agonist triptorelin inhibits estradiol-induced serum response element (SRE) activation and c-fos expression in human endometrial ovarian and breast cancer cell. *Journal of Endocrinology*. (2004); 151:619-628.
- [41] R. Duan, W. Xie, R.C. Burghardt & S. Safe. Estrogen receptor-mediated activation of the serum response element in MCF-7 cells through MAPK-dependent phosphorylation of Elk-1. *Journal of Biological Chemistry*. (2001) 276:11590–11598.
- [42] R.X. Song, R.A. McPherson, L. Adam, Y. Bao, M. Shupnik, R. Kumar & R.J. Santen. Linkage of rapid estrogen action to MAPK activation by Era–Shc association and Shc pathway activation. *Molecular Endocrinology*. (2002) 16:116–127.
- [43] M.K. El-Tanani, C.D. Green, Two separate mechanisms for ligand-independent activation of the estrogen receptor, *Mol. Endocrinol.* (1997); 11:928–937.
- [44] P. Le Goff, M.M. Montano, D.J. Schodin, B.S. Katzenellenbogen, Phosphorylation of the human estrogen receptor. Identification of hormone-regulated sites and examination of their influence on transcriptional activity, *J. Biol. Chem.* (1994); 269:4458–4466.

- [45] D. Chen, P.E. Pace, R.C. Coombes, S. Ali, Phosphorylation of human estrogen receptor alpha by protein kinase A regulates dimerization, *Mol. Cell. Biol.* (2002); 19:1002–1015.
- [46] D.A. Schreihofner, E.M. Resnick, V.Y. Lin, M.A. Shupnik, Ligand-independent activation of pituitary ER: dependence on PKA stimulated pathways, *Endocrinology*. (2001); 142:3361–3368.
- [47] K.M. Coleman, M. Dutertre, A. El-Gharbawy, B.G. Rowan, N.L. Weigel, C.L. Smith, Mechanistic differences in the activation of estrogen receptor- $\alpha$  (ER $\alpha$ )- and ER $\alpha$ -dependent gene expression by cAMP signaling pathway(s), *J. Biol. Chem.* (2003); 278:12834–12845.
- [48] H. Lahooti, T. Thorsen, A. Aakvaag, Modulation of mouse estrogen receptor transcription activity by protein kinase C delta, *J. Mol. Endocrinol.* (1998); 20:245–259.
- [49] R.A. Campbell, P. Bhat-Nakshatri, N.M. Patel, D. Constantinidou, S. Ali, H. Nakshatri, Phosphatidylinositol 3-kinase/AKT-mediated activation of estrogen receptor alpha: a new model for anti-estrogen resistance, *J. Biol. Chem.* (2001); 276:9817–9824.
- [50] M.B. Martin, T.F. Franke, G.E. Stoica, P. Chambon, B.S. Katzenellenbogen, B.A. Stoica, M.S. McLemore, S.E. Olivo, A. Stoica, A role for Akt in mediating the estrogenic functions of epidermal growth factor and insulin-like growth factor I, *Endocrinology* (2000); 141:4503–4511.
- [51] P.B. Joel, A.M. Traish, D.A. Lannigan, Estradiol and phorbol ester cause phosphorylation of serine 118 in the human estrogen receptor, *Mol. Endocrinol.* (1995); 9:1041–1052.

- [52] S. Kato, Y. Masuhiro, M. Watanabe, Y. Kobayashi, K.I. Takeyama, H. Endoh, J. Yanagisawa, Molecular mechanism of a cross-talk between oestrogen and growth factor signalling pathways, *Genes Cells*. (2000); 5:593–601.
- [53] K. Yamakawa, J. Arita, Cross-talk between the estrogen receptor-, protein kinase A-, and mitogen-activated protein kinase-mediated signaling pathways in the regulation of lactotroph proliferation in primary culture, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* (2004); 88:123–130.
- [54] J.G. Pierce, T.F. Parsons. Glycoprotein hormones: structure and function. *Annu Rev Biochem*, (1981); 50:465.
- [55] J.A. Dias, B. Lindau-Shepard, C. Hauer, I. Auger. Human follicle-stimulating hormone structure-activity relationships. *Biol Reprod* (1998); 58:13331.
- [56] J.S. Richards, D.L. Russell, S. Ochsner, K.H. Hsieh, A.E. Doyle, Y.K. Falender, S.C. Lo, Sharma, Novel signaling pathways that control ovarian follicular development, ovulation, and luteinization, *Recent Prog. Horm. Res.* (2002); 57:195–220.
- [57] A. Ulloa-Aguirre, C. Timossi. Structure-function relationship of follicle-stimulating hormone and its receptor. *Hum Reprod*. (1998); 4:260-283.
- [58] A. Ulloa-Aguirre, P.M. Conn. *Handbook of Physiology: Molecular and Cellular Endocrinology*, Cap. 6. Oxford Press, New York, (1998); 87-124.
- [59] A. Ulloa-Aguirre, P.M. Conn. G protein-coupled receptors and G proteins. En: Conn PM, Means AR, O'Malley BW (eds). *Principles of Molecular Regulation*. Humana Press, NJ, (2000); 3-25.
- [60] A. Ulloa-Aguirre, D. Stanislaus, J.A. Janovick, P.M. Conn. Structure-activity relationships of G protein-coupled receptors. *Arch Med Res.* (1999) a; 30:420-435.

- [61] C. Timossi, D. Maldonado, A. Vizcaíno, B. Lindau-Shepard, P.M. Conn, A. Ulloa-Aguirre. Structural determinants in the second loop of the human follicle-stimulating hormone receptor are involved in Gs protein activation. *Mol Cell Endocrinol.* (2002); 189:157-168.
- [62] J.S. Richards, New signaling pathways for hormones and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate action in endocrine cells, *Mol. Endocrinol.* (2001); 15:209–218.
- [63] M.R. Cameron, J.S. Foster, A. Bukovsky, J. Wimalasena, Activation of mitogen-activated protein kinases by gonadotropins and cyclic adenosine 5'-monophosphates in porcine granulosa cells, *Biol. Reprod.* (1996); 55:111–119.
- [64] I.J. Gonzalez-Robayna, A.E. Falender, S. Ochsner, G.L. Firestone, J.S. Richards, Follicle-Stimulating hormone (FSH) stimulates phosphorylation and activation of protein kinase B (PKB/Akt) and serum and glucocorticoid-Induced kinase (Sgk): evidence for A kinaseindependent signaling by FSH in granulosa cells, *Mol. Endocrinol.* (2000); 14:1283–1300.
- [65] E.T. Maizels, J. Cottom, J.C. Jones, M. Hunzicker-Dunn, Follicle stimulating hormone (FSH) activates the p38 mitogen-activated protein kinase pathway, inducing small heat shock protein phosphorylation and cell rounding in immature rat ovarian granulosa cells, *Endocrinology.* (1998); 139:3353–3356.
- [66] R. Seger, T. Hanoch, R. Rosenberg, A. Dantes, W.E. Merz, J.F. Strauss III, A. Amsterdam, The ERK signaling cascade inhibits gonadotropin-stimulated steroidogenesis, *J. Biol. Chem.* (2001); 276:13957–13964.

- [67] V.G. Keshamouni, R.R. Mattingly, K.B. Reddy. Mechanism of 17- $\beta$ -estradiol-induced Erk 1/2 activation in breast cancer cells. A role for HER and PCK- $\delta$ . *J. Biol. Chem.* (2002); 277: 22558-22565.
- [68] X.N. Wang, G.S. Greenwald, Synergistic effects of steroids with FSH on folliculogenesis, steroidogenesis and FSH- and hCG-receptors in hypophysectomized mice, *J. Reprod. Fertil.* (1993); 99:403–413.
- [69] S.C. Sharma, J.W. Clemens, M.D. Pisarska, J.S. Richards, Expression and function of estrogen receptor subtypes in granulosa cells: regulation by estradiol and forskolin, *Endocrinology* (1999); 140:4320–4334.
- [70] J.V. Ramírez. Tema R-02 Hormonas gonadotrópicas.
- [71] B. Vannier, H. Loosfelt, G. Meduri, C. Pichon, E. Milgrom, Antihuman FSH receptor monoclonal antibodies: immunochemical and immunocytochemical characterization of the receptor, *Biochemistry* (1996); 35:1358–1366.
- [72] K.C. Choi, S.K. Kang, C.J. Tai, N. Auersperg, P.C. Leung, Folliclestimulating hormone activates mitogen-activated protein kinase in preneoplastic and neoplastic ovarian surface epithelial cells, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* (2002); 87:2245–2253.
- [73] J.A. Parrott, V. Doraiswamy, G. Kim, R. Mosher, M.K. Skinner, Expression and actions of both the follicle stimulating hormone receptor and the luteinizing hormone receptor in normal ovarian surface epithelium and ovarian cancer, *Mol. Cell. Endocrinol.* (2001); 172:213–222.
- [74] M.A. Rossing, J.R. Daling, N.S. Weiss, D.E. Moore, S.G. Self. Ovarian tumors in a cohort of infertile women. *N Engl J Med*, (1994); 331:771.

[75] Z. Shoham. Epidemiology, etiology, and fertility drugs in ovarian epithelial carcinoma: where are we today. *Fertil Steril*, (1994); 62:433.

[76] American Cancer Society. [http://www.cancer.org/eprise/main/docroot/STT/content/STT\\_1x\\_Cancer\\_Facts\\_\\_Figures\\_\(2002\)](http://www.cancer.org/eprise/main/docroot/STT/content/STT_1x_Cancer_Facts__Figures_(2002)) .

[77] A.M. Pasapera, R. Gutierrez-Sagal, J. Herrera, N. Galicia-Canales, G. Garcia de la Mora, A. Ulloa-Aguirre, Norethisterone is bioconverted to oestrogenic compounds that activate both the oestrogen receptor alpha and oestrogen receptor beta in vitro, *Eur. J. Pharmacol.* (2002); 452:347–355.

[78] R. Gutierrez-Sagal, A. Nieto, Molecular cloning of the cDNA and the promoter of the hamster uteroglobin/Clara cell 10-kDa gene (ug/cc10): tissue-specific and hormonal regulation, *Arch. Biochem. Biophys.* (1998); 350:214–222.

[79] A. Chauchereau, M. Georgiakaki, M. Perrin-Wolff, E. Milgrom, H. Loosfelt, JAB1 interacts with both the progesterone receptor and SRC-1, *J. Biol. Chem.* (2000); 275:8540–8548.

[80] S. Ramirez, S. Ait-Si-Ali, P. Robin, D. Trouche, A. Harel-Bellan, A. Ait Si Ali, The CREB-binding protein (CBP) cooperates with the serum response factor for transactivation of the c-fos serum response element, *J. Biol. Chem.* (1997); 272:31016–31021.

[81] J.F. Savouret, F. Fridlanski, M. Atger, M. Misrahi, R. Berger, E. Milgrom, Origin of the high constitutive level of progesterone receptor in T47-D breast cancer cells, *Mol. Cell. Endocrinol.* (1991); 75:157–162.

[82] C.A. Mendoza-Rodriguez, H. Merchant-Larios, Md. Mde. L. Segura- Valdez, N. Moreno-Mendoza, M.E. Cruz, P. Arteaga-Lopez, I. Camacho-Arroyo, R. Dominguez, M.

Cerbon, Expression of p53 in luminal and glandular epithelium during the growth and regression of rat uterus during the estrous cycle, *Mol. Reprod. Dev.* (2002); 61:445–452.

[83] A.M. Pasapera, R. Guti'erez-Sagal, R. Garc'ia-Becerra, A. Ulloa- Aguirre, F. Savouret, Transactivation of progesterin- and estrogenresponsive promoters by 19-nor progesterins in African green monkey kidney CV1 cells, *Endocrine* (2001); 16:217–225.

[84] U. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* (1970); 227:680–685.

[85] H. Towbin, R. Staehelin, J. Gordon, Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (1979); 76:4350–4354.

[86] A.M. Pasapera Limon, J. Herrera-Munoz, R. Gutierrez-Sagal, A. Ulloa-Aguirre, The phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor LY294002 binds the estrogen receptor and inhibits 17beta-estradiol-induced transcriptional activity of an estrogen sensitive reporter gene, *Mol. Cell. Endocrinol.* (2003); 200:199–202.

[87] P. Yi, M.D. Driscoll, J. Huang, S. Bhagat, R. Hilf, R.A. Bambara, M. Muyan, The effects of estrogen-responsive element- and ligandinduced structural changes on the recruitment of cofactors and transcriptional responses by ER alpha and ER beta, *Mol. Endocrinol.* (2002); 16:674–693.

[88] C.L. Smith, S.A. Onate, M.J. Tsai, B.W. O'Malley, CREB binding protein acts synergistically with steroid receptor coactivator-1 to enhance steroid receptor-dependent transcription, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (1996); 93:8884–8888.

[89] N. Vo, R.H. Goodman, CREB-binding protein and p300 in transcriptional regulation, *J. Biol. Chem.* (2001); 276:13505–13508.

- [90] E.P. Slater, G. Redeuhl, K. Theis, G. Suske, M. Beato, The uteroglobin promoter contains a noncanonical estrogen responsive element, *Mol. Endocrinol.* (1990); 4:604–610.
- [91] J. Quintana, R.W. Hipkin, J. Sanchez-Yague, M. Ascoli, Follitropin (FSH) and a phorbol ester stimulate the phosphorylation of the FSH receptor in intact cells, *J. Biol. Chem.* (1994); 269:8772–8779.
- [92] D.A. Lannigan, Estrogen receptor phosphorylation, *Steroids.* (2003); 68: 1–9.
- [93] H.C. Wen, W.C. Huang, A. Ali, J.R. Woodgett, W.W. Lin, Negative regulation of phosphatidylinositol 3-kinase and Akt signalling pathway by PKC, *Cell Signal.* (2003); 15:37–45.
- [94] E.T. Alarid, N. Bakopoulos, N. Solodin, Proteasome-mediated proteolysis of estrogen receptor: a novel component in autologous downregulation, *Mol. Endocrinol.* (1999); 13:1522–1534.
- [95] A.L. Wijayaratne, D.P. McDonnell, The human estrogen receptor $\alpha$  is a ubiquitinated protein whose stability is affected differentially by agonists, antagonists, and selective estrogen receptor modulators, *J. Biol. Chem.* (2001); 276:35684–35692.
- [96] V. Marsaud, A. Gougelet, S. Maillard, J.-M. Renoir, Various phosphorylation pathways, depending on agonist and antagonist binding to endogenous estrogen receptor  $\alpha$  (ER $\alpha$ ), differentially affect ER $\alpha$  extractability, proteasome-mediated stability and transcriptional activity in human breast cancer cells, *Mol. Endocrinol.* (2003); 17:2013–2027.
- [97] H.W. Tsai, J.A. Katzenellenbogen, B.S. Katzenellenbogen, M.A. Shupnik, Protein kinase A activation of estrogen receptor  $\alpha$  transcription does not require proteasome



activity and protects the receptor from ligand-mediated degradation, *Endocrinology*. (2004); 145 :2730–2738.

[98] G. Lazennec, J.A. Thomas, B.S. Katzenellenbogen, Involvement of cyclic AMP response element binding protein (CREB) and estrogen receptor phosphorylation in the synergistic activation of the estrogen receptor by estradiol and protein kinase activators, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* (2001); 77:193–203.

[99] P. Webb, P. Nguyen, P.J. Kushner, Differential SERM effects on corepressor binding dictate ER alpha activity in vivo, *J. Biol. Chem.* (2003); 278:6912–6920.

[100] G.G. Kuiper, B. Carlsson, K. Grandien, E. Enmark, J. Haggblad, S. Nilsson, J.A. Gustafsson, Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta, *Endocrinology* (1997); 138:863–870.

[101] R. Michalides, A. Griekspoor, A. Balkenende, D. Verwoerd, L. Janssen, K. Jalink, A. Floore, A. Velds, L. van't Veer, J. Neefjes, Tamoxifen resistance by a conformational arrest of the estrogen receptor  $\alpha$  after PKA activation in breast cancer, *Cancer Cell*. (2004); 5: 597–605.

[102] P. Diel, Tissue-specific estrogenic response and molecular mechanisms, *Toxicol. Lett.* (2002); 127:217–224.

[103] D. Chakravarti, V.J. LaMorte, M.C. Nelson, T. Nakajima, I.G. Schulman, H. Juguilon, M. Montminy, R.M. Evans, Role of CBP/P300 in nuclear receptor signalling, *Nature*. (1996); 383:99–103.

[104] Y. Kamei, L. Xu, T. Heinzel, J. Torchia, R. Kurokawa, B. Gloss, S.C. Lin, R.A. Heyman, D.W. Rose, C.K. Glass, M.G. Rosenfeld, A CBP integrator complex mediates

transcriptional activation and AP-1 inhibition by nuclear receptors, *Cell*. (1996); 85:403–414.

[105] Y. Kobayashi, T. Kitamoto, Y. Masuhiro, M. Watanabe, T. Kase, D. Metzger, J. Yanagisawa, S. Kato, p300 mediates functional synergism between AF-1 and AF-2 of estrogen receptor alpha and beta by interacting directly with the N-terminal A/B domains, *J. Biol. Chem.* (2000); 275:15645–15651.

[106] R. Janknecht, A. Nordheim, MAP kinase-dependent transcriptional coactivation by Elk-1 and its cofactor CBP, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1996); 228:831–837.

[107] Y.Z. Liu, J.C. Chrivia, D.S. Latchman, Nerve growth factor upregulates the transcriptional activity of CBP through activation of the p42/p44(MAPK) cascade, *J. Biol. Chem.* (1998); 273:32400–32407.

[108] K. Zanger, L.E. Cohen, K. Hashimoto, S. Radovick, F.E. Wondisford, A novel mechanism for cyclic adenosine 3',5'-monophosphate regulation of gene expression by CREB-binding protein, *Mol. Endocrinol.* (1999); 13 :268–275.

[109] B.G. Rowan, N. Garrison, N.L. Weigel, B.W. O'Malley, 8-Bromocyclic AMP induces phosphorylation of two sites in SRC-1 that facilitate ligand-independent activation of the chicken progesterone receptor and are critical for functional cooperation between SRC-1 and CREB binding protein, *Mol. Cell. Biol.* (2000); 20:8720–8730.

[110] L. Klein-Hitpass, M. Schorpp, U. Wagner, G.U. Ryffel, An estrogenresponsive element derived from the 5' flanking region of the *Xenopus vitellogenin A2* gene functions in transfected human cells, *Cell*. (1986); 46:1053-1061

[111] P. Marsters, N.R. Kendall, B.K. Campbell, Temporal relationships between FSH receptor, type 1 insulin-like growth factor receptor, and aromatase expression during FSH-

induced differentiation of bovine granulosa cells maintained in serum-free culture, *Mol. Cell. Endocrinol.* (2003); 203:117–127.

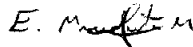
[112] S.M. Aronica, W.L. Kraus, B.S. Katzenellenbogen, Estrogen action via de cAMP signaling pathway: stimulation of adenylate cyclase and cAMP-regulated gene transcription, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (1994); 91:8517–8521.

[113] B.M. Jaber, R. Mokopadhyay, C.L. Smith, Estrogen receptor- $\alpha$  interaction with the CREB binding protein coactivator is regulated by the cellular environment, *J. Mol. Endocrinol.* (2004); 32:307–323.

[114] P.J. Fuller, S. Chu, S. Fikret, H.G. Burger, Molecular pathogenesis of granulosa cell tumours, *Mol. Cell. Endocrinol.* (2002); 191:89–96.

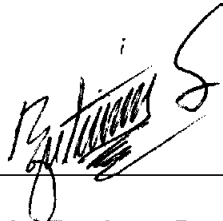
**JURADO DE EXAMEN**

Los integrantes del jurado, designados por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa, aprobaron la presente tesis “TRANSACTIVACIÓN DE PROMOTORES ESTRÓGENO REGULADOS POR LA HORMONA ESTIMULANTE DEL FOLÍCULO (FSH)” el día 31 de Agosto del año 2006.



---

*M. en B. E. Enrique Mendieta Márquez*  
**PRESIDENTE**



---

*Dr. Rubén Gutiérrez Sagal.*  
**VOCAL**



---

*Dra. Cristina Alcida Olivares Segura.*  
**SECRETARIO**