UNIVERSIDAD VERACRUZANA

FACULTAD DE QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA

"Influencia de Prolactina (PRL) en la expresión de ARNm del REβ en células LNCaP"

TESIS

Para acreditar la experiencia Recepcional de la carrera de Químico Farmacéutico Biólogo

Presenta:

Claudia López Preza

Director de Tesis

Dr. José Locia Espinoza

Co- Director de Tesis

Dr. Fausto Rojas Durán

Xalapa, Ver **Enero 2014**

UNIVERSIDAD VERACRUZANA

FACULTAD DE QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA

CARTA DE ACEPTACIÓN DE TRABAJO RECEPCIONAL CONCLUIDO

"Influencia de Prolactina (PRL) en la expresión del ARNm del REβ en células LNCaP"

MODALIDAD TESIS

QUE PARA ACREDITAR LA EXPERIENCIA RECEPCIONAL DE LA CARRERA DE QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

Claudia López Preza

Dr. José Locia Espinoza
Director del trabajo

Firma

Dr. Fausto Rojas Durán
Co-directora del trabajo

Firma

Dr. Abraham H. Soto Cid
Sinodal

Firma

Dra. Luz Irene Pascual Mathey
Sinodal

Firma

XALAPA, VERACRUZ

17 DE DICIEMBRE 2013.

ESTA TESIS FUE REALIZADA EN EL LABORATORIO DE NEUROENDOCRINOLOGÍA DEL INSTITUTO DE NEUROETOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD VERACRUZANA, EN LA CIUDAD DE XALAPA-ENRÍQUEZ, VERACRUZ, BAJO LA TUTORÍA DEL DR. JOSÉ LOCIA ESPINOZA Y EL DR. FAUSTO ROJAS DURÁN.

DEDICATORIAS

A MI PADRE
Por ser mi orgullo, ejemplo de dedicación y tenacidad en lo que sabes hacer, porque eres el mejor de todos…mi héroe.

A MI MADRE
Gracias por brindarme siempre la mejor educación: moral, espiritual y escolar. Por querer siempre lo mejor para mí.

A MIS HERMANAS
Porque además de compartir una casa y una familia, hemos compartido muchas aventuras, son mis cómplices de vida, mis únicas y verdaderas amigas las quiero.

A ALBERTO
Ganaste mi cariño con tu dedicación, compañía, sorpresas y sonrisa, por acompañarme en este vuelo y significar estos elementos en mi vida: Telurio, Americio y Oxígeno.

A MAURICIO Y RUBÉN
Por ser mis compañeros de carrera, juntos vivimos muchas cosas inolvidables son mis grandes amigos.

AGRADECIMIENTOS

A MI DIRECTOR DE TESIS

Dr. José Locia Espinoza, muchas gracias por el apoyo que me brindó a lo largo de este tiempo, porque sin darse cuenta su confianza en mí, hizo que la mía creciera, su apoyo jamás me faltó y eso fue fundamental para que hoy esté aquí. De todo corazón gracias… Mi respeto y admiración.

A MI CO-DIRECTOR

Dr. Fausto Rojas Durán, muchas gracias por los conocimientos compartidos, por los consejos que me brindó, pero sobre todo por el apoyo que jamás me faltó, mi profundo respeto, gracias.

A MIS SINODALES

Dr. Abraham H. Soto Cid y Dra. Luz Irene Pacual Mathey, muchas gracias por sus valiosas sugerencias, tiempo, comentarios, por su participación en la realización de esta tesis, son dos grandes personas a las que admiro profesionalmente.

A LA DRA. MARÍA ELENA HERNÁNDEZ AGUILAR

Muchas gracias por permitirme realizar esta tesis en el laboratorio de Neuroendocrinología, por sus consejos y aprendizaje adquirido.

AL PERSONAL DEL LABORATORIO DE NEUROENDOCRINOLOGIA DEL INSTITUTO DE NEUROETOLOGÍA

Muchas gracias por compartir conmigo sus conocimientos, su tiempo en sugerencias y consejos, por hacerme sentir parte de esta familia académica.

1. RESUMEN

Los estrógenos son hormonas sexuales esteroideas, derivadas del ciclopentanohiperfenantreno, estas moléculas son de carácter lipofílico, ejercen su efecto mediante la unión a sus receptores (RE), de los cuales existen dos formas la α y β. Se sabe que el estradiol (E_2) mediante la unión al REα puede producir proliferación celular mientras que la unión al REβ, la inhibe. El REβ se expresa en cerebro, hígado, hueso, útero, glándulas mamarias y próstata. En esta última se expresa tanto en estado normal como patológico, como lo son las células de cáncer prostático (LNCaP), las cuales son modelos útiles para estudiar esta patología en próstata. La próstata es una glándula accesoria dependiente de andrógenos, como testosterona (T) y dihidrotestosterona (DHT), pero también se ha demostrado que su mantenimiento celular está influenciado por estrógenos y prolactina (PRL), cuyos receptores y componentes de vías de señalización se expresan en la próstata y líneas celulares de cáncer prostático. La función de REβ en próstata no se conoce del todo, pero existen indicios de que participa en la producción de secreciones y en el control de la proliferación epitelial. En cuanto a la regulación de su expresión, se sabe que T la incrementa, E_2 la inhibe, y recientemente, un estudio en cuerpo lúteo ha demostrado que la expresión del REβ en influencia de PRL es dosis-dependiente. Dentro de las vías de señalización activadas por PRL se encuentran la Jak/Stat, MAPK, Src y P13K, las cuales se cree que están implicadas en la activación de la transcripción del REβ, lo cual tiene como consecuencia un aumento del ARN mensajero (ARNm). Por ello, en la presente tesis se analizó mediante la técnica de RT-PCR, la expresión del ARNm de REβ en células LNCaP, en respuesta a la estimulación con concentraciones de PRL de 5, 10, 25, 50, 100 y 200 nM, encontrando un aumento significativo de la expresión del ARNm de REβ a las concentraciones de 10 a 100 nM. Con estos resultados esperamos que el conocimiento sobre la acción prolactínica en próstata, contribuya para desarrollar estrategias para el tratamiento y prevención del cáncer de próstata (CaP).

ÍNDICE

Contenido

1.RESUMEN……vi

2. INTRODUCCIÓN……1

3. ANTECEDENTES……..3

3.1 Estrógenos……..3

3.2 Estructura general de los RE……..5

3.3 Isoformas de RE……6

3.4 Receptor a estrógenos β……..7

3.5 Antagonismo sobre el REα, función de la regulación de la proliferación celular……8

3.6 Características de la próstata……..9

3.7 Efecto antiproliferativa del REβ en próstata……..11

3.8 Regulación de la expresión de REβ por PRL……..13

3.9 Expresión de REβ en LNCaP……15

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA……17

5. HIPÓTESIS……..18

6. OBJETIVOS: GENERAL Y PARTICULARES ……..18

7. DISEÑO EXPERIMENTAL……19

8. MATERIALES Y MÉTODOS……..20

9. RESULTADOS……28

10. DISCUSIÓN……32

11. CONCLUSIONES……..34

12 BIBLIOGRAFÍA……..35

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química de principales ligandos para RE (estradiol, estriol y estrona)……..5

Figura 2. Estructura y descripción de los dominios que conforman a los RE……6

Figura 3. Representación del RPRL (largo, intermedio y corto)……..…..…11

Figura 4. Mecanismo de acción de la vía Jak/Stat mediada por PRL. ……..…...14

Figura 5. Metodología para la determinacion del ARNm del REβ en celulas LNCaP estimuladas con distintas concentraciones de PRL…….19

Figura 6. Aspecto de las células al transcurrir 72 horas después de su siembra……..28

Figura 7. Integridad de ARN ……..…29

Figura 8. Curva de expresión de ARNm de REβ……..……..30

Figura 9. Expresión de ARNm de REβ en el tratamiento con dosis variables de PRL……...31

2. INTRODUCCIÓN

El CaP es la segunda enfermedad neoplásica que más afecta a hombres, superada sólo por el cáncer de pulmón, la cual suele manifestarse entre la cuarta y quinta década de vida (Enmark y Gustafsson, 1999).

Se sabe que durante esta etapa existe aumento en el peso de la próstata de los individuos, y que la proporción andrógenos/estrógenos se altera, los niveles de T disminuyen mientras que los de E_2 aumentan. El aumento de los estrógenos produce proliferación celular en próstata, la cual es dependiente de andrógenos para el mantenimiento celular, por lo cual al existir una disminución de los andrógenos y un aumento en los estrógenos en esta etapa de la vida, se incrementa la probabilidad de padecer CaP (McPherson et al., 2007).

Los estrógenos ejercen sus efectos mediante la unión a sus receptores (RE), existen dos tipos de RE; REα y REβ, los cuales tienen efectos antagónicos, mientras que el REβ inhibe la proliferación celular, el REα la estimula, proliferación que puede consecuentemente llevar a padecer CaP (Morani et al., 1998). Además de la T y el E_2, que tienen efectos en la fisiología normal de la próstata y en estado patológico, existen estudios que muestran que PRL también tiene influencia en el desarrollo y progresión del CaP. Los efectos de PRL se dan a través de la unión a sus receptores (RPRL), los cuales activan vías de señalización, una de ellas es la vía Jak/Stat, la cual activa la transcripción del REβ en cuerpo lúteo y pituitaria de rata (Telleria et al., 1998). Es probable que esta regulación también se produzca en próstata, la activación prolactínica de la expresión de REβ podría ser parte del mecanismo patológico de PRL sobre la glándula, ya que diversos estudios demuestran que el REβ es un factor de sobrevivencia de las células cancerígenas en estados avanzados tales como la metástasis (Locia et al., 2013).

Por lo anterior, resulta de importancia para el presente trabajo contribuir al conocimiento del desarrollo del CaP en cuanto a la participación de PRL y del REβ. Para ello, se pretende demostrar la influencia de PRL sobre la expresión de REβ en la línea celular de cáncer prostático (LNCaP), la cual cuenta con todas las características bioquímicas necesarias para considerarse un modelo experimental que simule las condiciones de la próstata, ya que expresa receptores a andrógenos, a estrógenos y a prolactina. Para ello, se estimularon las celulas utilizando distintas concentraciones de PRL: 5, 10, 25, 50, 100 y 200 nM durante 30 minutos, para después analizar la expresión de ARNm de REβ, mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa por transcripción reversa (RT-PCR).

3. ANTECEDENTES

3.1 Estrógenos

La palabra estrógeno se deriva de la palabra latina “celo” o del griego “oistros”, que se refiere a la etapa en que las hembras son sexualmente receptivas. Los estrógenos fueron considerados durante años como hormonas femeninas y los andrógenos como hormonas masculinas, hasta 1980, cuando se encontró que los estrógenos también ejercían efectos en machos, rompiendo el paradigma que antes se tenía sobre estas moléculas (Weihua et al., 2002).

Los estrógenos son molécula que se derivan del colesterol, por lo cual son de carácter lipofílico, es decir, de carácter no polar y por ello, tienen la capacidad de atravesar la membrana celular con facilidad (Nillson et al., 2001). En cuanto a su biosíntesis, se lleva a cabo en las gónadas y glándula adrenal, mientras que su metabolismo o biotransformación se realiza en hígado, con la participación de enzimas, que catalizan reacciones de: hidroxilación, oxidación y reducción (Beato y Klug, 2000).

El citocromo P450 (CYP 450) que se encuentra en hígado, es el sistema catalizador encargado de convertir al colesterol en T, la cual puede ser aromatizada en varios tejidos para formar estradiol (Morani et al., 2008).

Los estrógenos tienen efectos sobre el crecimiento, desarrollo y diferenciación de tejidos, aunque su acción principal se observa en órganos reproductivos (Koehler et al., 2005). Se ha demostrado que en tejidos como hígado, cerebro, sistema cardiovascular y hueso, también regulan procesos, tales como el mantenimiento de la densidad ósea y el equilibrio hidroelectrolítico. En hembras, existen tres principales estrógenos: estrona, estriol y estradiol (Figura 1), siendo este último, el principal ligando para sus receptores y el más abundante (Bonkhoff et al., 2009).

El mecanismo mediante el cual los estrógenos ejercen sus efectos, es a través de los RE, moléculas que pertenecen a la superfamilia de receptores nucleares clase II. Son proteínas que funcionan como factores de transcripción de la expresión génica (Harris, 2007). En ausencia de ligando, los RE están unidos a proteínas chaperonas de choque térmico (por sus siglas en inglés, HSP). Las HSP tienen un peso de 90 kDA, por lo que se denominan HSP90. Cuando el receptor se encuentra unido a las HSP su actividad como factor de transcripción se encuentra modulada, ya que permanece en una conformación que mantiene ocultos sus péptidos señal de localización nuclear (SLN) (Sabbah et al.,1996). Cuando se produce la unión ligando-receptor, el RE se separa de las HSP, y pone al descubierto sus SLN lo que permite la traslocación hacia el núcleo, donde se unen directo a los elementos de respuesta de estrógenos (ERE), palíndromas con la secuencia GGGTCAnnnTGACC, donde n representa un nucleótido cualquiera. Estos ERE son parte de la secuencia promotora de genes blanco responsivos a estrógenos. La interacción con secuencias promotoras es el estímulo necesario para provocar el ensamblaje de la maquinaria de transcripción y la consecuente expresión de los genes que se encuentran bajo influencia estrogénica (Gruber et al., 2004).

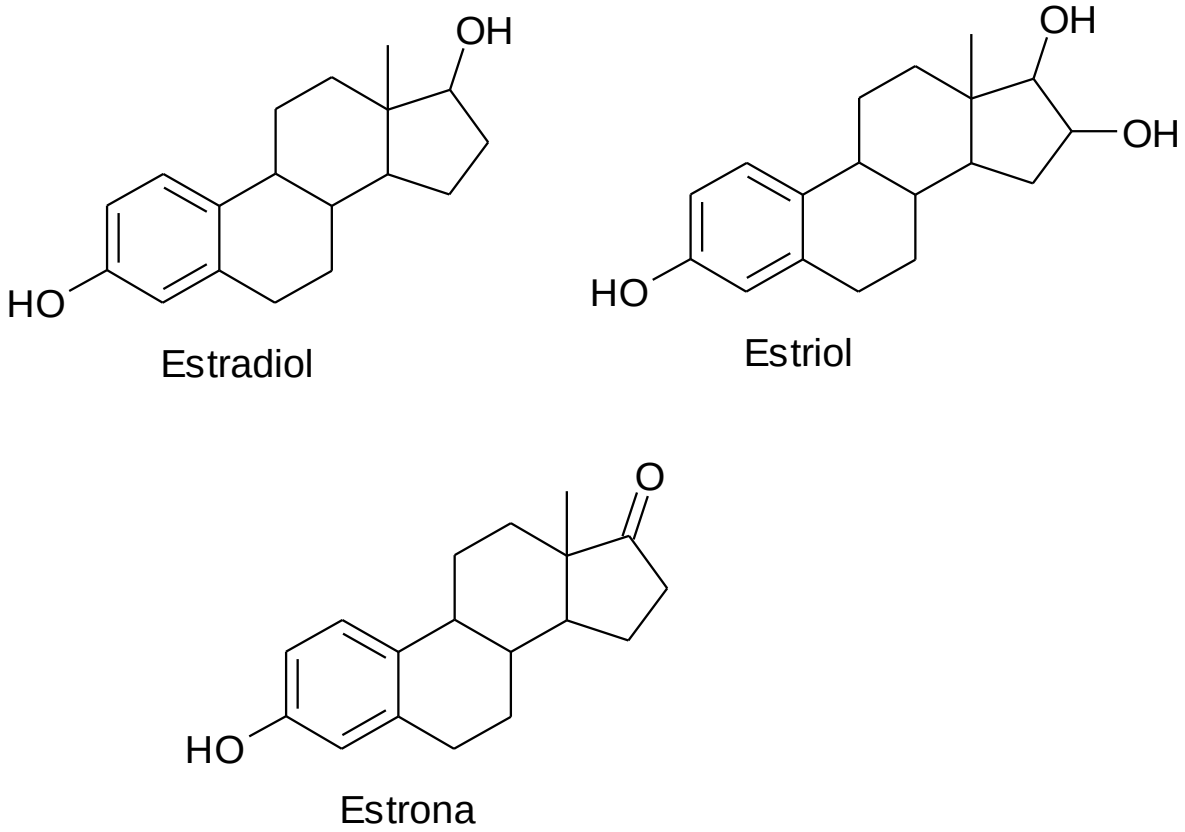

Figura 1. Estructura química de principales ligandos para RE (estradiol, estriol y estrona) (Tomado de Locia et al., 2013).

3.2 Estructura general de los RE

La estructura terciaria de los RE, está caracterizada por cinco dominios designados con las letras A a la F, los cuales son: el dominio A/B o NH_2-terminal, el cual contiene sitios de fosforilización regulados por cinasas y que participa en la interacción proteína-proteína (Morani et al., 2008), este dominio es el que más varía entre los miembros de la superfamilia de receptores nucleares (Koehler et al., 2005); el dominio C o de unión a ADN (DUA), el cual contiene dos dedos de zinc-cisteína que se unen al surco mayor del ADN. Uno de estos dedos contiene una caja proximal con tres aminoácidos específicos para este receptor, el segundo dedo de zinc, posee la función de dimerización y además es el que se une a los sitios específicos del promotor (Gruber et al., 2004). El dominio D o de bisagra confiere características de flexibilidad, por su parte, el dominio E o de unión a ligando (DUL) incluye la región

encargada del reconocimiento de los estrógenos, los cuales son ligandos específicos de los RE. Por último, el dominio F no tiene funciones exactamente definidas, aunque se cree que contribuye a la capacidad de activación de transcripción global del receptor (Beato y Klug, 2000) (Figura 2).

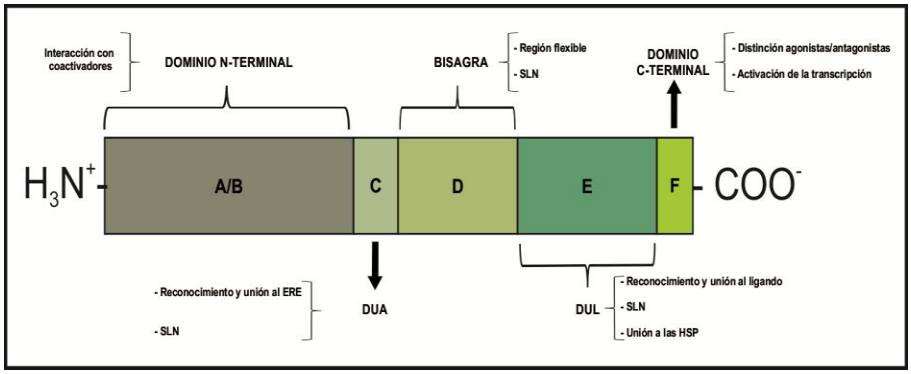

Figura 2. Estructura y descripción de los dominios que conforman a los RE. (Tomado de Locia et al., 2013).

3.3 Isoformas de los RE

Existen dos tipos de receptores a estrógenos que se conocen respectivamente como REα y REβ, el primero en ser descubierto fue el REα, más de diez años después se identificó el REβ por el grupo de Jan-Ake Gustafsson, a partir de ADN complementario (ADNc) de próstata de rata. Los REα y REβ están constituidos por 595 y 530 aminoácidos, respectivamente (Kuiper at al., 1997). A esta diferencia, se añaden las siguientes: comparten entre si el 56% de identidad compuesto por 12 plegamientos α-helice, comparten el 18% de homología en su dominio NH_2-Terminal, un 96% de identidad en el dominio DUA, además poseen un aminoácido distinto en la zona de unión, donde el REα contiene en la posición 384 Metionina y REβ Leucina, (Dupont et al., 2000). De manera específica para el REα, se conocen los siguientes efectos: cambios en los depósitos de grasa en el cuerpo, desarrollo y crecimiento mamario, mantenimiento de la densidad ósea, regulación

hidroeletrolítica, control de la conducta sexual masculina. En machos, la función más importante es la reabsorción de fluidos en túbulos seminíferos, por lo cual, concentra una mayor cantidad de espermatozoides, existiendo mayor probabilidad de fecundación. Por otro lado, participan en aspectos relacionados con la proliferación celular, en este aspecto se sabe que REα y REβ poseen efectos antagónicos uno del otro. El efecto proliferativo atribuido a los estrógenos son producto de la activación de REα, mientras que el efecto que se produce por la activación del REβ no es del todo conocido, sin embargo evidencia sugiere que su activación pudiera tener un efecto protector contra la hiperplasia prostática benigna (HPB) y el CaP, debido a este hecho, en el presente trabajo resulta de interés el estudio de este receptor, para esclarecer un poco más el comportamiento del REβ (Locia et al., 2013).

3.4 Receptor a estrógenos β

Su descubrimiento se dio a conocer en 1996 en un Simposio, por Jan-Ake Gustafsson, anunciando que su grupo de trabajo había descubierto una segunda forma del RE, y que denominó REβ, el cual es un factor de transcripción, cuyo gen está localizado en el locus 14q22-24 del cromosoma 14 (Enmark y Gustafsson, 1999). Fue clonado a partir de una biblioteca de ADNc de próstata y ovario de rata, el cual se encontró que es altamente homologa al RE, pues posee 95% de similitud en el dominio de unión a DNA y 55% en el dominio de unión a ligando. Por otra parte, existen diversas isoformas del REβ, las cuales se derivan del mismo gen y son producto de inserciones o deleciones de exones, lo que ocasiona que sean distintos en el DUL. Tales isoformas se designan del 2 a 5, por ejemplo, la isoforma 2 que es la más estudiada, se sabe que muestra poca afinidad por ligandos y que forma heterodímeros con el REα los cuales son inactivos, contribuyendo al antagonismo entre el REα y REβ (Zhu et al., 2004).

El REβ se expresa en diversos órganos como cerebro (Wang et al., 2006), sistema cardiovascular, hueso, glándula mamaria, útero, testículos, glándulas salivales, ovario, parénquima de pulmón, colon, músculo liso y próstata (Scordalakes et al., 2002)

Se sabe que posee afinidad a los siguientes ligandos: E_2 > estriol > estrona. Además de estos ligandos, muestra afinidad por estrógenos que no son de tipo fisiológico, y que son metabolitos secundarios de la soya, a este tipo de estrógenos se les denomina fitoestrógenos, ejemplo particular es el de la genisteína y cumestrol, su consumo está asociado a la reducción de la incidencia en cáncer de mama, colon y próstata. Estos fitoestrógenos muestran mayor afinidad por el REβ, su selectividad es 30 veces más que por el REα, por ello se supone que la activación del REβ por los fitoestrógenos, reducen la proliferación celular y en consecuencia previenen la aparición del cáncer (Kuiper et al.,1997).

3.5 Antagonismo sobre el REα, función de la regulación de la proliferación celular

Son aún muy pocos los estudios realizados en relación al REβ, por lo cual aun no hay información exacta acerca del comportamiento de este receptor. Lo que se sabe acerca de la función del REβ, se ha esclarecido gracias a que se han demostrado que muchos de sus efectos son antagónicos a los del REα, el cual ejerce la mayoría de los efectos que se atribuyen a los estrógenos, entre los que se encuentra la inducción de la proliferación celular que paulatinamente puede llegar a un estado patológico como lo es el cáncer (Nilsson y Gustafsson, 1999). Todo esto se ha concluido de diversos estudios que muestran que existe una relación entre la perdida del REβ y la progresión hacia el cáncer, puntualizando en este hecho podemos mencionar los casos en glándula mamaria, cuerpo lúteo, cerebro y colon:

En glándula mamaria se comparo el tejido sano en comparación con tejido con lesiones benignas hiperplásicas, encontrándose que en tejido normal existía mayor expresión de REβ que en el tejido con lesiones (Roger et al., 2001).

En aparato reproductor femenino la expresión de REβ es alta en miometrio normal mientras que en leiomiomas es baja tanto en niveles de expresión del ARNm como de su proteína (Chu et al., 2003).

Por su parte en células astrocíticas, óseas y de colon también se observa perdida del REβ en células tumorales o metastasicas en comparación con las normales (Bardin et al., 2004)

Todos los hallazgos antes mencionados han llevado a sugerir que uno de los efectos del REβ es el de regular la proliferación celular, función que resulta interesante estudiar en próstata, pues la presente tesis está enfocada a estudiar al REβ en relación con esta glándula.

3.6 Características de la próstata

La próstata es la glándula más grande en machos, su función es la de secretar componentes que forman parte del fluido seminal para coadyuvar a la fertilidad del individuo, las cuales ayudan al trayecto de los espermatozoides por el útero hasta llegar al óvulo, además deshacen el coágulo seminal posibilitando aun más la función espermática (Taylor et al., 2006). Posee forma de nuez y está situada en la pelvis, rodeando a la uretra y situada debajo de la vejiga, la cual está dividida en tres zonas: transicional, central y periférica, en cuanto a la expresión de REβ en próstata normal, la mayor expresión se encuentra en la zona periférica, observándose lo contrario en la zona central (Ross y Pawlina, 2007). La próstata en una glándula que contiene un epitelio formado por células secretoras dependientes de andrógenos, por ello se dice que esta glándula es andrógeno dependiente (Kawashima y Nakatani, 2012).

En esta glándula, T, el principal andrógeno debe ser transformado por la 5α-reductasa en dihidrotestosterona (DHT), el cual es un andrógeno más potente ya que tiene mayor afinidad por el receptor a andrógenos (RA) (Ricke et al., 2008), el cual también es un factor de transcripción activado por unión a ligando, sus efectos se producen cuando estos ligandos se unen al RA. Hay evidencia de que no sólo los andrógenos controlan funciones biológicas en próstata, sino también estrógenos. Estos últimos ejercen sus efectos proliferativos mediante la unión al REα (Prins et al., 2006). Además de los andrógenos y estrógenos se ha mostrado que la PRL también tiene influencia en la glándula prostática ya que interviene en la producción de

secreciones y la proliferación (Castellon et al., 2005). A este respecto, se sabe que PRL puede inducir proliferación descontrolada, llevando al desarrollo de patologías como la HPB y el CaP (McPherson et al., 2007).

PRL es un polipéptido lactógeno que está conformada por 199 aminoácidos (Castelán, 2000), la cual se encuentra dividida en tres secciones y cuyas secciones están unidas por un enlace disulfuro entre distintos residuos de cisteína (Cys^{4}-Cys^{11}, Cys^{58}-Cys^{174} y Cys^{191}-$Cys^{199)}$ (Bole-Feysot et al., 1998), el gen que codifica para PRL se encuentra localizado en el cromosoma 6, y está compuesto por 5 exones y 4 intrones, perteneciendo a la familia de las citocinas. La secreción de PRL es realizada por la dopamina hipotalámica (Huang at al., 1999), además su síntesis se lleva a cabo por los lactotropos de la adenohipófisis. Entre las funciones que realiza, se reporta la regulación del balance de fluidos (Freeman et al., 2000), la síntesis de leche en glándula mamaria, la osmorregulación, crecimiento de pelo, piel y desarrollo de gónadas (Neill y Nagy, 1994). Existen distintas isoformas de PRL: la pequeña de 22.5 kDa, grande-grande (100 kDa), grande (50 kDa), pequeña-pequeña y la forma glicosilada (Nevalainen et al., 1997).

PRL está implicada en la HPB y el CaP, pues regula el desarrollo y la diferenciación celular en próstata. Los receptores de PRL (RPRL) se encuentran localizados en la membrana celular y pertenecen a la superfamilia de receptores de citocinas clase 1 (Van Coppenolle et al., 2001). En modelos animales como rata y ratón el gen que codifica para el RPRL se encuentra en el cromosoma 5, existiendo diversas isoformas del RPRL, que resultan del splicing alternativo (Perrot-Applanat et al.,1997). Existen tres isoformas: larga, intermedia y corta, las cuales se diferencian en su longitud. Los cuales están constituidos por 591, 393 y 291 aminoácidos respectivamente (Ouhtit et al., 1993). Estos receptores se expresan tanto en células LNCaP, como en células normales de próstata, por ello es lógico pensar que existe influencia de PRL en cuanto a la regulación del mantenimiento celular en próstata, pero no existen estudios que describan este comportamiento.

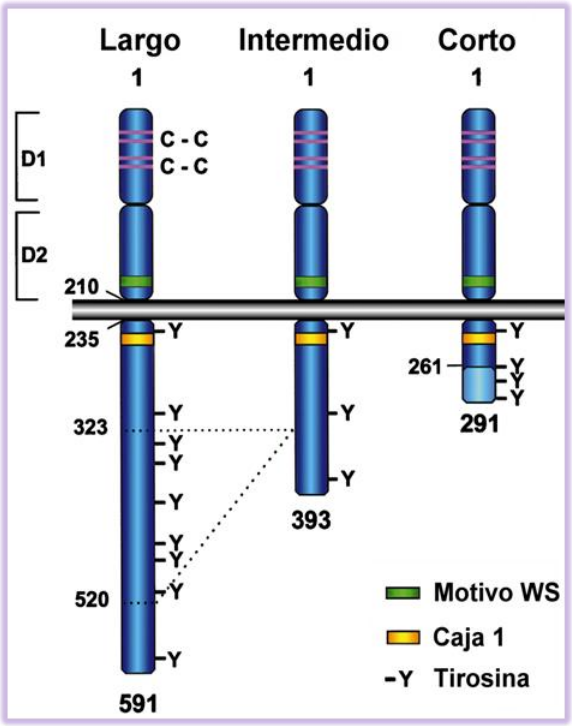

Figura 3. Representación de los RPRL en rata (largo, intermedio y corto). (Tomado de Bole- Feysot et al.,1998)

3.7 Efecto antiproliferativo del REβ en próstata

La evidencia de que el REβ es un regulador de la proliferación prostática, proviene de estudios donde se demuestra su expresión.

Ensayos realizados tanto en modelos animales como en humanos han demostrado que a medida que se disminuía la expresión de REβ, se conducía a un estado metastásico: neoplasia intraepitelial prostática de alto grado (NIP) (Bardin et al., 2004), por ello se sugirió que este receptor tenía un efecto antiproliferativo. Dicho efecto se comprobó utilizando ratones REβ -/-. Tres grupos de trabajo (Nueva York, Francia y Suecia) produjeron ratones βERKO, es decir, ratones que no expresan a este receptor, los cuales a la edad de seis meses, presentaban las siguientes características: aumento de la expresión del RA, hiperplasia en próstata ventral,

disminución de la glutatión peroxidasa, además, observaron anomalías en la diferenciación celular, pues expresaban marcadores que producen celulas incompletamente diferenciadas: P63 y CK19 (Weihua et al., 2002).

Otros estudios utilizaron ratones deficientes de la enzima aromatasa, la cual pertenece a una vía de señalización en el estroma de la próstata, condición que resulta de la inactivación del REβ, en donde se observó un aumento de los niveles de andrógenos que consecuentemente conduce a hiperplasia, por ello, hoy en día las terapias que consiste en la inhibición de la aromatasa en cáncer de próstata son inefectivas, además se observaron índices de apoptosis menores en comparación con el tejido sano y acumulación de células basal-intermediarias, por lo que se concluyó que el REβ actuaba como supresor de tumores (McPherson et al., 2012).

Un ensayo clínico realizado con 132 pacientes, mostró pérdida del REβ en tejido con metástasis, en comparación con tejido sano, se observó además que existían deleciones en el cromosoma 14q, donde se localiza el gen que codifica para el REβ, al parecer, la expresión de la proteína del REβ y del ARNm disminuyen en el CaP. Gracias a todas estas investigaciones se ha concluido que el REβ está implicado en la progresión tumoral y en el desarrollo del CaP, y que además de todo lo anterior, en etapas de cáncer avanzado, el REβ se encuentra ausente (Zhu et al., 2004).

La evidencia anterior muestra que el REβ podría estar involucrado en el mantenimiento de la proliferación celular prostática en niveles normales, ya que se ha comparado la expresión del REβ en próstatas normales y aquéllas que muestran algún trastorno en la proliferación, y en tejido sano existe mayor expresión que en próstatas con proliferación celular, concluyendo que REβ podría evitar la aparición de trastornos hiperproliferativo (Pandini et al., 2007).

3.8 Regulación de la expresión del REβ por PRL

Aunque se sabe que la expresión del REβ es controlada tanto por andrógenos como por estrógenos, existe evidencia de que PRL también participa en este proceso, pues en ratas, sometidas a conducta sexual, se ha observado que entre la primera y segunda eyaculación, existe un aumento de estrógenos así como de PRL, el cual está acompañado del incremento del ARNm del REβ en próstata (Locia et al.,2013).

En cuerpo lúteo, el tratamiento con PRL incrementa la expresión del REβ, lo mismo ocurre en pituitaria, glándulas mamarias y células deciduales, pues en estudios con ratas preñadas, se analizó la expresión del ARNm del REβ mediante RT-PCR, encontrándose que la expresión de este receptor durante toda la gestación mantenía en niveles constantes, disminuyendo significativamente en el parto (Frasor et al., 2001a).

Además, en ratas hipofisectomizadas se disminuía la expresión de este receptor, y sus niveles se restablecían mediante la administración de PRL, por lo que utilizando células CG-CL (línea celular de cuerpo luteo), evaluaron la expresión del REβ en presencia de este lactógeno, encontrando una respuesta dosis-dependiente. Por lo que se concluyó que PRL regula la esteroidogénesis en cuerpo lúteo y que aumentaba la expresión del REβ (Tellería et al., 1998).

En pituitaria, células deciduales y glándula mamaria, se observó un incremento en la expresión de REβ, a causa del tratamiento con PRL, por lo que se cree que la expresión de REβ se da através de la activación de la vía Jak/Stat, cuyo mecanismo de acción, inicia cuando PRL se une a su receptor provocando la dimerización de éste, con los consecuentes cambios conformacionales en su dominio citoplasmático. Estos cambios provocan a su vez la activación de una proteína Jak, molécula con actividad de tirosina cinasa asociada al dominio intracelular de receptor a PRL. Cuando las tirosinas del dominio citoplasmático del receptor a PRL (RPRL) son fosforiladas por Jak, se convierten en sitios de anclaje para las proteínas citoplasmáticas STAT. Estas proteínas son luego agrupadas por las tirosinas fosforiladas y subsecuentemente fosforiladas también por las proteínas Jak. Cuando

STAT se fosforila, puede asociarse con otra proteína STAT fosforilada y el dímero así formado se trasloca a núcleo, donde actúa como factor de transcripción al unirse a sus elementos de respuesta en los promotores de genes blanco (Figura 4) (Frasor et al., 2001a). Además, la vía Jak/Stat es la más utilizada por los receptores a citocinas, familia donde se encuentra la PRL, por lo tanto, PRL aumenta la expresión del REβ (Frasor et al., 2001b).

3.9 Expresión del REβ en LNCaP

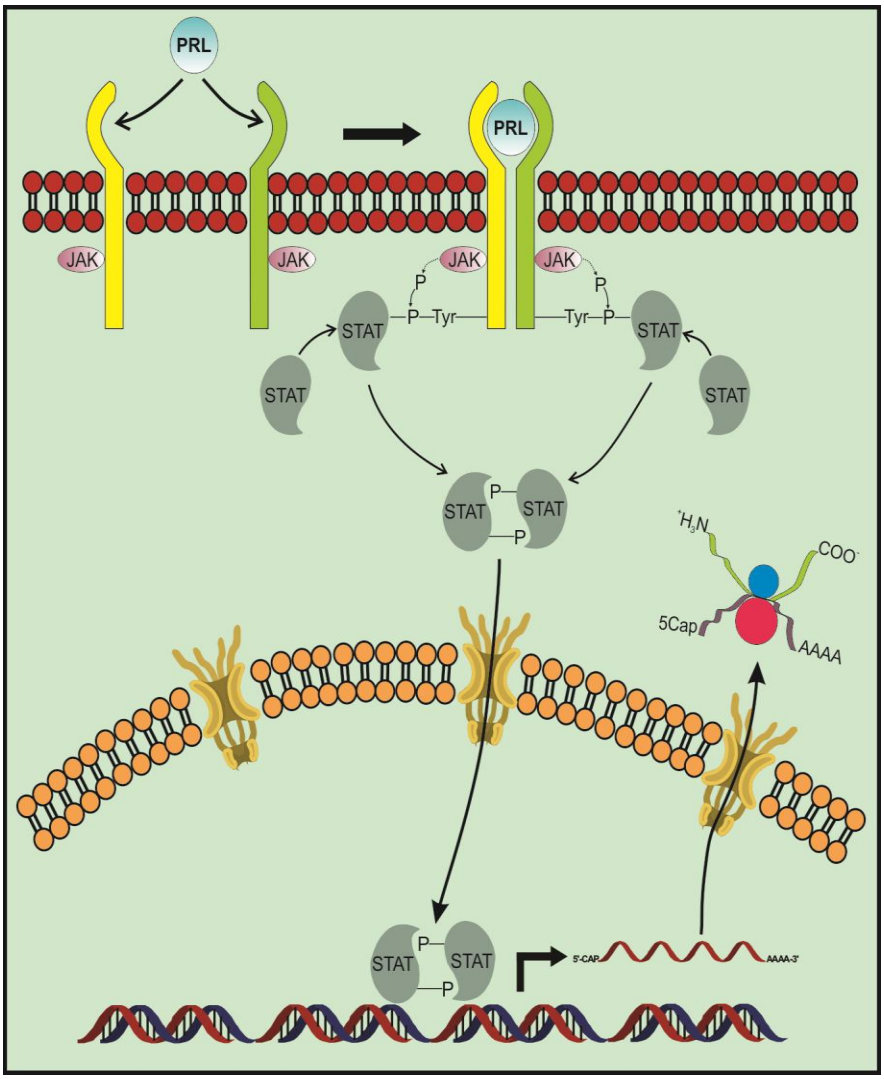

Figura 4. Mecanismo de acción de la vía Jak/Stat mediada por PRL (Tomado de Locia et al.,2013).

La línea celular LNCaP se estableció a partir de una lesión metastásica de adenocarcinoma prostático humano en 1983, por Horoszewicz y colaboradores. En años anteriores, para poder estudiar muestras de carcinoma prostático se hacía através de cultivos provenientes de modelos animales (rata y ratón), la desventaja era la poca similitud de la próstata de animales con la de humano, y por ende, la confiabilidad de los resultados. En comparación con tumores, éstas crecen fácilmente *in vitro* conservando su fenotipo epitelial, es decir, crecen en monocapas, el medio idóneo para estas células es RPMI-1640 (medio 1640 del Roswell Park Memorial Institute), complementado con SBF (suero fetal bovino), el cual le provee factores de crecimiento y una mezcla de los antibióticos penicilina/estreptomicina. Poseen una forma alargada, su tiempo de duplicación es de 60 horas, además estas células conservan su malignidad por provenir de una lesión metastásica, poseen capacidad de respuesta a hormonas, contienen un marcador de CaP, una glicoproteína denominada fosfatasa acida y antígeno prostático especifico (PSA)(Horoszewicz et al., 1983). La línea celular LNCaP expresa REα y REβ, y es sensible tanto a andrógenos como a estrógenos. Experimentos con esta línea celular utilizando técnicas de Inmunohistoquímica han revelado que el REβ se expresa tanto en citosol como en el núcleo (Takahashi et al., 2007). Además, en células epiteliales normales y cultivos primarios, la expresión del ARNm del REβ es similar al de las LNCaP (Zhu et al., 2004).

En comparación con otras líneas celulares prostáticas como las DU-145 (metástasis en cerebro) y PC-3 (metástasis en hueso), posee una mayor o igual expresión del REβ. Por lo anteriormente descrito en otros apartados, se sabe que al ser dependientes de andrógenos y estrógenos, estas células poseen características importantes de respuesta fisiológica en presencia de las ya mencionadas, misma importancia que en años recientes se ha descubierto en PRL, las células LNCaP al igual que las células normales de próstata, depende de andrógenos para proliferar y sintetizar proteínas características como PSA. Por otra parte, las células LNCaP son andrógeno dependientes, por lo cual expresan al RA, receptor que en esta línea celular presenta una mutación puntual en el gen que codifica para el DUL, la cual no afecta su responsividad por andrógenos (Maggiolini et al., 2004) Su responsividad no

se limita sólo a los andrógenos sino también a los estrógenos, los cuales tambie también se expresan en próstata normal, en ensayos se ha determinado la existencia de REβ y REα en esta línea celular (Pandini et al., 2007). Existe además otra hormona que ejerce sus efectos en estas células, la PRL, la cual ejerce su acción, através de la unión a sus RPRL que se encuentran en membrana asociados a enzimas con actividad tirosina quinasa, los cuales se encuentran clasificados como receptores clase 1, y que como se mencionó anteriormente, existen diferentes isoformas de los RPRL, forma corta, intermediaria y larga según su longitud. Del cual se ha demostrado que esta línea celular solo se expresan las formas corta y larga (Bole- Feysot et al.,1998).Estos receptores están implicados como componentes de la vía de señalización Jak/Stat, además las LNCaP expresan, las proteínas Jak quinasas, que poseen actividad enzimática de tirosina quinasa y las Stat, que son transductoras de señales y activadoras de la transcripción, componentes de la vía de señalización Jak/Stat (Locia et al., 2013). Además de poseer todos estos componentes, esta línea celular también posee componentes para otras vías de señalización como la vía de señalización de las MAPK cuyo mecanismo de transducción intracelular se activa mediante la unión de PRL a su receptor membranal. Este mecanismo también está asociado a la influencia que tiene PRL sobre el crecimiento y funcionamiento prostático, por todas las características antes mencionadas, las LNCaP fueron elegidas para la realización de esta tesis (Pascual et al., 2009).

4. PLANTAMIENTO DEL PROBLEMA

Tras la evidencia mostrada en los antecedentes, se sabe que el REβ posee efecto inhibidor sobre la proliferación celular, y que en próstata posee un papel en la fisiología normal y patológica de la misma, de la cual se ha demostrado que además de ser una glándula dependiente a andrógenos, también lo es de estrógenos, y que recientemente se ha demostrado que PRL también ejerce acciones en esta glándula. Estas hormonas están ligadas estrechamente a la proliferación celular y consecuentemente a un estado patológico como el CaP. REβ se expresa en LNCaP, la cual además de expresar el REβ, posee receptores para PRL, es decir, es sensible a este lactógeno, el cual, también está implicado en la regulación fisiológica de la próstata, sin embargo, existen muy pocos estudios realizados del efecto que pueda producir PRL ante la expresión del REβ. En cuerpo lúteo, se encontró una respuesta dosis-dependiente, concluyéndose que el E_2 junto con PRL, regulan la esteroidogénesis en cuerpo lúteo. Por ello, ante la carencia de estudios que nos ayuden a comprender el efecto de PRL en próstata, el presente trabajo pretende poner de manifiesto tal efecto, utilizando como modelo experimental la línea celular LNCaP, la cual, fue elegida por las características que posee, las cuales proporcionan buena correlación con el humano, ante lo cual se pretende contribuir al conocimiento de la influencia de PRL en la expresión de REβ en próstata.

5. HIPÓTESIS

- PRL aumenta la expresión del REβ en células LNCaP.

6. OBJETIVOS

Objetivo general

●Determinar el efecto de la estimulación con PRL, sobre la expresión del REβ en la línea celular LNCaP.

Objetivos particulares

● Estandarizar las condiciones óptimas para realizar la técnica de RT-PCR para REβ en células LNCaP.

● Evaluar mediante la técnica de RT-PCR la expresión de ARNm de REβ en cultivos de LNCaP.

7. DISEÑO EXPERIMENTAL

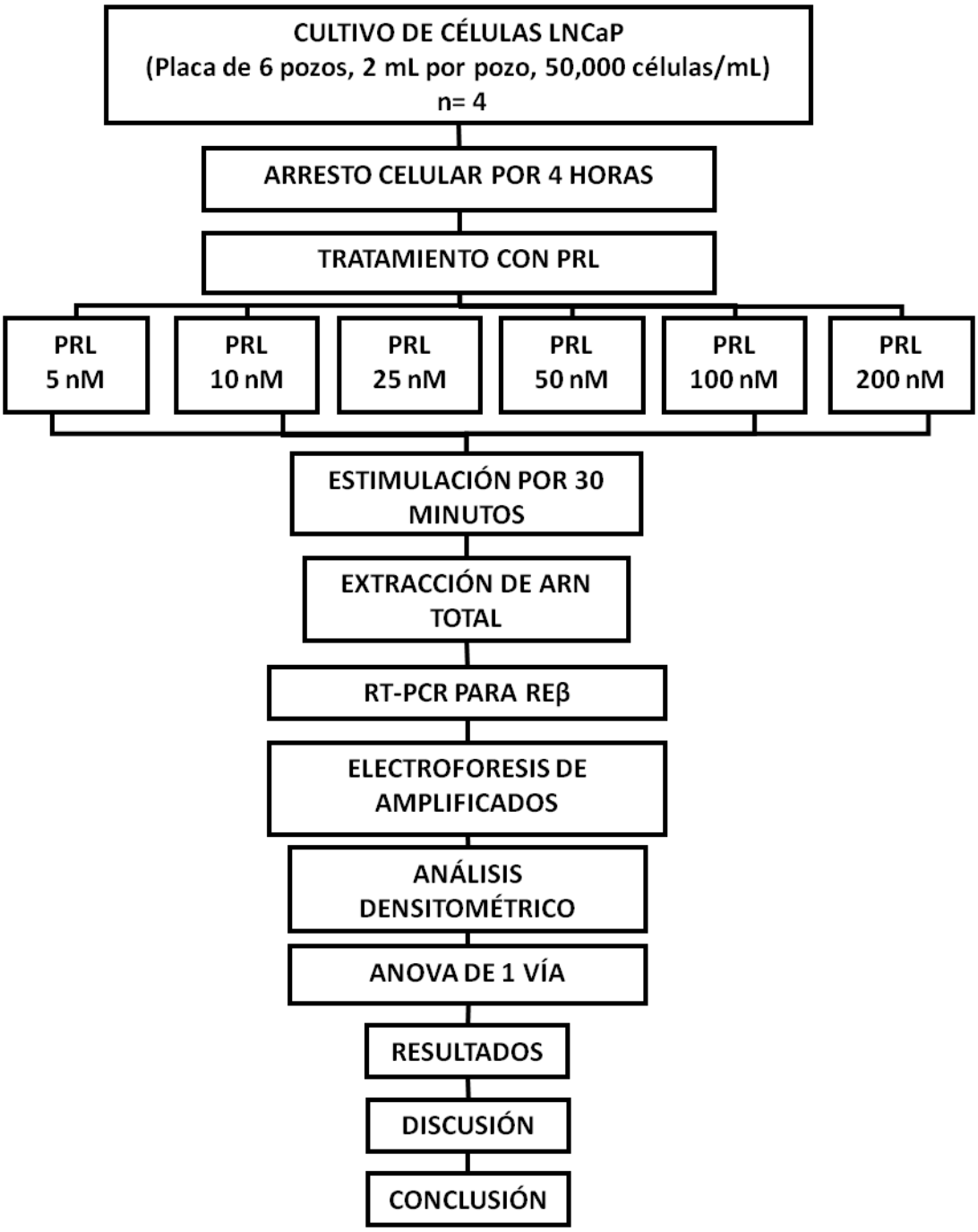

Figura 5. Diseño experimental para la determinacion del ARNm del REβ en células LNCaP estimuladas con distintas concentraciones de PRL.

8. MATERIALES Y METODOS

8.1 Cultivo y mantenimiento de la línea celular LNCaP.

Las células LNCaP se obtuvieron por donación de la Dra. Elizabeth Langley del Instituto Nacional Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Subirán”. Fueron inoculadas en placas petri estériles de poliestIreno de 90 X 20 mm (Sarsted), utilizando 10 mL de medio RPMI-1640 (SIGMA-ALDRICH) complementado con bicarbonato de sodio (SIGMA-ALDRICH) a una concentración de 2 g/L, piruvato de sodio (SIGMA-ALDRICH) 1 mM, suero fetal bovino (FBS, GIBCO, USA) al 10% (v/v) y penicilina-estreptomicina (P/S)(10,000 U/ml de penicilina y 10 mg/mL de estreptomicina en 0.9% de cloruro de sodio, SIGMA-ALDRICH) a una concentración de 1% (v/v). Los cultivos se mantuvieron a 37 °C en una atmósfera con CO2 al 5% con cambio de medio cada tercer día, los stocks de células iniciales se mantuvieron en esas condiciones hasta que alcanzaron una confluencia del 80%, y las cuales se transfirieron de la siguiente manera: se eliminó el medio de cultivo mediante decantación y las células fueron lavadas con 5 mL de PBS (SIGMA-ALDRICH, St. Louis, Mo, USA), homogenizando el buffer en la caja con movimientos circulares.

Las monocapas de las células fueron dispersas con 2mL de tripsina, posteriormente se incubaron por un tiempo de 3 minutos. Una vez transcurrido este lapso, se observaron las células para observar su desprendimiento, se golpeó suavemente la caja con movimientos laterales para facilitar el desprendimiento de las células. Se agregaron 4 mL de medio RPMI-1640 complementado (medio para crecimiento, el cual contenía FBS), para inactivar la tripsina, se esparcieron y homogenizaron mecánicamente con una pipeta de 10 mL, los 6 mL (2mL de tripsina+ 4mL de FBS), se transfirieron en un tubo con rosca cuya capacidad era de 15 mL, donde se repitió la acción de dispersión y homogenización de las células, este tubo se centrifugó durante 5 minutos a 2500rpm (D-78532, Hettich Zentrifuguen), posteriormente se decantó el contenido del tubo con un movimiento rápido y preciso, para eliminar restos de medio complementado y tripsina, al final de este movimiento se pudo observar la pastilla de células en el fondo del tubo, posteriormente se reconstituyó el volumen (6 mL de medio complementado), se dispersó y homogenizó

el precipitado de células, con un pipeteo firme pero constante para no maltratar las células, se procedió a contar las células en una cámara de Neubauer, tomando 20 µL de estas células, se adicionaron en un tubo cuya capacidad fue de 500 µL (CRM), y se mezclaron con 80 µL de azul de tripán (SIGMA), el tubo que se utilizó para esta mezcla debía contener el azul de tripán desde el lavado de las células (dilución 1:5), entonces se homogenizó esta mezcla y se tomaron 10µL para el conteo. El azul de tripán se utilizó para descartar las células viables de las no viables, se dejaron reposar las células en la cámara de Neubauer durante 3 minutos a temperatura ambiente, y se procedió a realizar el conteo, descartando las células que se tiñieron de azul, el conteo se realizó en los cuadros externos de la cámara, correspondiente para leucocitos, el cálculo del número total de las células se realizó con la siguiente fórmula:

(Números total de células contadas/8)(10000)(Factor de dilución)(Volumen de medio donde se re suspenden las células).

Las células obtenidas se utilizaron para llevar a cabo los experimentos y/o mantener un cultivo (stock), el cual contuvo 1,000,000 de células en caja petri estéril con 10 mL de medio complementado como antes se describió, las cuales se dejaron durante 3 días, con cambio de medio en el segundo día, después de este tiempo volvieron a transferirse.

8.2 Siembra en cajas de 6 pozos y arresto celular.

Los inóculos iniciales se mantuvieron en las condiciones mencionadas para el stock alrededor de una semana, momento en el cual alcanzaron una confluencia de aproximadamente 70-80%. Posteriormente, se procedió a realizar el proceso de subcultivo. Para ello, el medio de cultivo complementado (medio de crecimiento) se retiró de las placas mediante decantación y las células se lavaron con 5 mL de Buffer de Fosfato Salino (PBS, SIGMA-ALDRICH) agregando éste a la placa, realizando después movimientos circulares suaves y finalmente decantándolo. En seguida se agregaron 2 mL de solución de tripsina-EDTA 1X (0.5 g de tripsina porcina y 0.2 g de EDTA●4Na por litro de Solución Balanceada de Hanks con rojo de fenol, SIGMA

ALDRICH) y se incubó por 3-5 minutos a 37 °C en atmósfera con CO2 al 5%. Después de la incubación, la placa se agitó mediante golpeo suave sobre las paredes de la misma para coadyuvar al proceso de despegado de las células inducido por tripsina. A continuación, se adicionaron 4 mL de medio de crecimiento para inactivar la tripsina y se homogenizó mediante pipeteo para completar el proceso de disociación de las células. La mezcla se colocó en un tubo cónico estéril de centrífuga de 15 mL (Corning), se volvió a homogenizar por pipeteo y se centrifugó a 2500 rpm durante 5 minutos en una centrífuga (D-78532, Hettich Zentrifuguen). Después de la centrifugación, se decantó el sobrenadante para eliminar los restos de tripsina y se adicionó el mismo volumen de medio de crecimiento nuevo. Se homogenizó por pipeteo y se tomaron 20 µL de la mezcla, colocándolos después en un tubo estéril de 500 µl (CRM) previamente adicionado con 80 µL de azul de tripan (SIGMA) y se mezcló para obtener una solución de células en proporción 1:5. De esta solución, se tomaron 10 µl y se colocaron en cada una de las cuadrículas para conteo celular de una cámara de Neubauer (Brand). Después de 3 minutos a temperatura ambiente se realizó un conteo de las células viables (aquellas que no incorporan el azul de tripan) presentes en los cuatro cuadrantes externos de la cuadrícula, utilizando el objetivo seco débil (10X) (Leica). El conteo de los 8 cuadrantes externos totales de la cámara de Neubauer fue promediado y luego utilizado para conocer el número de células por ml, así como el número de células totales en el tubo de 15 mL. Para ello, el promedio de células se multiplicó por 10,000 y luego por el factor de dilución (5), obteniéndose así el número de células por ml, mismo que se multiplicó por el volumen total en el tubo de 15 mL para obtener el número de células totales obtenidas del cultivo. Con este dato, se procedió a calcular el volumen necesario para obtener 1,000,000 células, las cuáles fueron colocadas en una placa de petri estéril nueva conteniendo 10 ml de medio de crecimiento y se incubaron en las condiciones antes indicadas. Este subcultivo (transferencia) se dejo crecer durante 72 horas (3 días), con cambio de medio a las 48. Pasado este tiempo, se realizó otro proceso de transferencia para continuar propagando las células o para obtener subcultivos a utilizar en los experimentos

planteados. Es importante mencionar que para el caso de los experimentos, se procuró que las células no tuvieran más de 13 transferencias.

8.3 Estimulación de la línea celular LNCaP con PRL

Una vez finalizada el arresto celular, se procedió a la estimulación con PRL (SIGMA-ALDRICH, St. Louis, Mo, USA), de la cual se preparó una solución stock con una concentración de 100 µM, se realizaron los cálculos para determinar la cantidad en volumen que había que adicionar para obtener las concentraciones de: 5, 10, 25, 50, 100 y 200 nM en el medio de arresto. A cada uno de los pozos se les adicionó medio no complementado y el volumen del estímulo con la concentración final.

8.4 Obtención de ARN total de REβ de células LNCaP estimuladas con PRL

8.4.1 Obtención de ARN total

Se obtuvo ARN total usando el reactivo TRIzol® (Invitrogen Life Technologies), primero se decantó el medio donde estaban contenidas las células y se adicionó 1 mL del reactivo a cada pozo de la placa, se lisaron las células y se homogenizó el contenido que después se vertió en tubos eppendorf de 1.5 mL (CRM), donde se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se adicionaron a los tubos 200 µL de cloroformo, para después agitar vigorosamente por 15 segundos, se incubó por 3 minutos a temperatura ambiente, para posteriormente centrifugar a 8000 rpm y 8 ºC en una centrífuga Hettich Zentrifuguen D-78532 durante 15 minutos. Al final se tomó la fase acuosa, y se colocó en un tubo estéril eppendorf de 1.5 mL.

8.4.2 Precipitación de ARN

A la fase acuosa se adicionaron 0.5 mL de alcohol isopropílico, se homogenizaron y luego se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugaron a 10000 rpm y 8 ºC durante 10 minutos, con lo cual se obtuvo el precipitado de ARN. Se removió el sobrenadante, se adicionó 0.5 mL de etanol al 75 % y se centrifugó a 7900 rpm y 8 ºC durante 5 minutos, se decantó el etanol y el tubo se dejó a temperatura ambiente, después se agregaron 26 µL de agua estéril para disolverlo con la punta de una pipeta de manera sueve en hielo. Las muestras de

ARN se mantuvieron guardadas a una temperatura de -70ºC en un ultracongelador NUAIRE hasta su utilización.

8.4.3 Determinación de la concentración del ARN total

Antes de determinar la concentración, cada tubo fue descongelado del ultracongelador y centrifugado, para la determinación se utilizaron 2µL del contenido de cada uno de los tubos, el cual se colocó en un foco óptico del Nanodrop ND-1000 para obtener la concentración de ARN total, se obtuvo además la densidad óptica de la muestra la cual se leyó a 260 y 280 nm de longitud de onda. El cociente de las absorbancias a ambas longitudes de onda correspondió a un valor de entre 1.6 y 1.8 y que denominamos RATIO , el cual nos indicó que el ARN tenía la pureza adecuada, este cociente fue calculado automáticamente por el equipo.

8.4.5 Electroforesis para el ARN

Esta electroforesis se realizó para determinar la integridad del ARN, primeramente se prepararon los geles de agarosa (Invitrogen Life Technologies) cuya concentración correspondía al 1 % en un volumen final de 120 mL de TBE 1X (6 gr de TRIS BASE (Bio-Rad), 3.08 gr de ácido bórico (Sigma-Aldrich), 0.372 gr de Na2EDTA•2H2O, contenidos en un litro con agua Mili-Q. Para obtener el gel, se colocó en un matraz Erlenmeyer 1.2 g de agarosa y se agregó 120 mL de TBE 1X, el matraz fue calentado durante 1:30 minutos en un horno de microondas convencional (Daewoo) el cual se agitó durante ese tiempo, después durante medio minuto cada 5 segundos, se detuvo el microondas para volver a agitar, en total la mezcla se calentó durante 2:00 minutos. Al finalizar este tiempo, la mezcla se vertió en un frasco cuyo contenido fue de 250 mL, en el cual se adicionó 4 µL de bromuro de etidio (Bio-Rad) y se homogenizó, sin agitar con un movimiento circular, sobre una superficie plana, la mezcla con bromuro de etidio se vertió en un molde de 15 pocillos (Bio-Rad) y se dejó gelificar a temperatura ambiente durante una hora. Transcurrido este tiempo se retiró del molde y se colocó en un equipo para electroforesis (Bio Rad), donde se añadieron 2L de TBE 1X, volumen que cubrió totalmente el gel. Para colocar las muestras de ARN en los pocillos del gel, se mezclaron 3 µL de la muestra con 3 µL

de una solución de glicerol-agua-azul de bromofenol (glicerol/agua, 1:1; una pizca de azul de bromofenol) en un pedazo de papel parafilm. Esta mezcla se colocó en los pocillos del gel y se sometió a electroforesis usando un voltaje de 100 V durante 1 hora, después de ese tiempo, el gel fue llevado a un fotodocumentador (Bio-Rad) del cual se obtuvo una imagen por fluorescencia con luz UV y se observaron las bandas correspondientes a las subunidades de ARNr, indicativas de la integridad de la muestra.

8.5 RT-PCR

8.5.1 Transcripción reversa.

Para obtener el ADNc se utilizaron reactivos Invitrogen Life Technologies, se marcaron los tubos a utilizar con capacidad de 0.2 mL, se adicionaron 2.5 µg de ARN en el volumen adecuado. Para determinar la cantidad de ARN utilizada, se procedió previamente a la realización de una curva en la que se probaron diferentes concentraciones de ARN. Tal como se indica en la sección correspondiente a RESULTADOS. Después de adicionar los 2.5 µg de ARN , a cada tubo se agregó 1 µL de oligo dt, 1 µL de DNTP's (5 µl de cada NTP 100 mM, en 50 µl de agua estéril) y WFI (agua para inyectables) hasta un volumen de 12 µL. Los tubos se calentaron a 70 ºC durante 3 minutos en un termociclador Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystems). Se preparó una mezcla de reactivos (Mix-RT) a partir del kit M-MLV Reverse transcriptase que contenía 1 µL de enzima transcriptasa reversa (200 U/µl), 5 µL de buffer 5X First Strand (Tris-HCl, 250 mM (KCl, 375 mM; MgCl2) y 2 µL de DTT (0.1 M), por cada muestra de ARN. Pasados 3 minutos de calentamiento a 70 °C, se adicionaron 8 µL de (Mix-RT) a cada uno de los tubos que después se llevaron de nuevo al termociclador, donde se sometieron al protocolo de temperaturas siguiente: 37 ºC durante 60 minutos, 94 ºC durante 3 min y finalmente 4 ºC hasta el momento de ser retirados. Con este procedimiento se obtuvieron 20 µL ADNc.

8.5.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Los reactivos con los que se realizó la técnica de PCR, fueron de la marca Invitrogen Life Technologies. Se procedió adicionando en un tubo de 500 µL, una mezcla de reactivos (Mix-PCR) que contenía, por cada tubo para amplificar: 2.5 µL de buffer 10X (Tris-HCl, 200 mM; KCl, 500 mM), 0.5 µL de oligonucleótido (50 pMoles/µL) sentido y antisentido para el REβ o G_3PDH, 1 µL de dNTP'S (5 µL de cada NTP 100 mM, en 50 µL de agua estéril), 0.75 µL de Mg^{2+} ($MgCl_2$, 50 mM), 0. 25 µL de la enzima Taq DNA Polymerase (5 U/µL) y WFI hasta un volumen final de 22.5 µL. En cada tubo se adiciono 2.5 µg de ADNc obtenido de la transcripción inversa y sometio al siguiente protocolo de tiempo: 1 ciclo a 95°C durante 5 minutos, 35 ciclos de 5 segundos a 95 °C, 30 segundos a 60 °C y 30 segundos a 72 °C, 1 ciclo a 72 °C durante 10 minutos, después de lo cual, fueron enfriados hasta 4 °C. Este procedimiento permitió obtener 25 µL de amplificado en cada tubo.

8.6 Electroforesis para amplificados

Se preparó el gel de la misma manera que para la electroforesis para la determinación del ARN, utilizando 5 µL de amplificado con 3 µL de glicerol-agua-azul de bromofenol y se colocaron en los pocillos del gel. Uno de los pocillos fue utilizado para colocar 1 µl de marcador de pares de bases (MPB) Trackit 100 bp DNA leader (Invitrogen life technologies) para determinar el tamaño de los productos de amplificación. Una vez colocadas las muestras de los amplificados y el MPB, las muestras se sometieron a electroforesis durante 1 hora a 100 V, el resultado de la electroforesis se determinó en el mismo equipo que el utilizado para comprobar la integridad de los ARN.

8.7 Análisis densitométrico.

Se obtuvo la imagen del gel mediante el programa Kodak 1D 3.6 a través de la estación de imágenes 440 CF de Kodak utilizando la lámpara UV y el filtro 4. Se determinó el background promedio e intensidad de cada una de las bandas, después se obtuvo la diferencia entre estos dos valores. Las diferencia de valores de cada banda de amplificado para el REβ fue dividida entre la correspondiente para la banda

de G_3PDH, con el fin de normalizar el efecto de la expresión génica constitutiva. Los cocientes REβ/G_3PDH fueron tomados como indicativos de la expresión relativa del gen del REβ para cada tratamiento utilizado.

8.8 Análisis estadístico.

Los datos obtenidos fueron analizados utilizando el método de ANOVA de 1 vía para muestras independientes y la prueba *post hoc* de Fisher LSD, el software que se utilizo para realizar la estadística fue StatSoft Inc 1984-2004.

9. RESULTADOS

9.1 Cultivos Celulares

Se obtuvieron cultivos celulares de LNCaP, los cuales, como se mencionó en la METODOLOGÍA, se sembraron con un inóculo inicial de 100,000 células contenidas en 2mL de medio RPMI-1640 complementado, las cuales crecieron durante tres días después de la siembra.

En la figura 6 se muestra el aspecto de las células que se utilizaron para realizar el presente trabajo.

Figura 6. Aspecto de las células al transcurrir 72 horas después de su siembra (objetivo 5X).

9.2 Obtención de ARN

Se obtuvo ARN y se cuantificó mediante la técnica descrita a partir de muestras de células LNCaP sometidas a tratamientos de PRL por 30 minutos, a concentraciones de 5, 10, 25, 50, 100 y 200 nM, después de lo cual se procedió a una electroforesis de los distintos ARN en un gel de agarosa al 1% en Buffer TBE 1X en un campo eléctrico de 100 V, con la finalidad de observar las tres bandas correspondientes a las subunidades de ARN ribosomal, indicativas de la integridad de la muestra.

En la figura 7 se muestra el patrón de bandas característico.

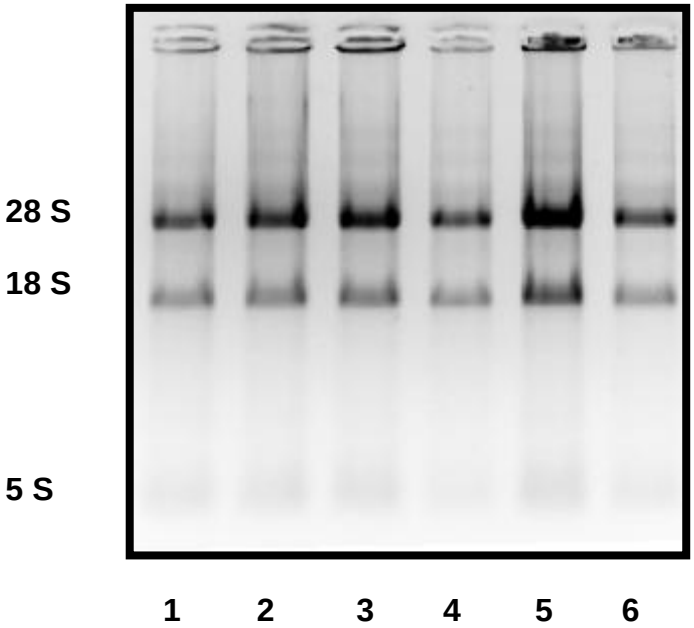

Figura 7. Patrón de bandas que confirman la integridad del ARN, en los carriles se observan tratamiento a diferentes concentraciones de PRL. 1, 5nM; 2, 10nM; 3, 25nM; 4, 50nM; 5, 100nM; 6, 200nM.

9.3 Obtención de curva de concentración de ARNm de REβ

Se retrotranscribieron, en tubos de reacción diferentes; 2, 2.5, 3, y 3.5 µg de ARN de células LNCaP sometidas a las mismas condiciones experimentales, exceptuando el hecho de que no tenían tratamiento con PRL. Posteriormente, 10 µl del ADNc de cada retrotranscripción fueron amplificados por separado utilizando 30 ciclos de amplificación y 50 pM de oligonucleótido.

En la figura 8 se muestra la intensidad de las bandas, que tiende a aumentar. La gráfica muestra esta tendencia.

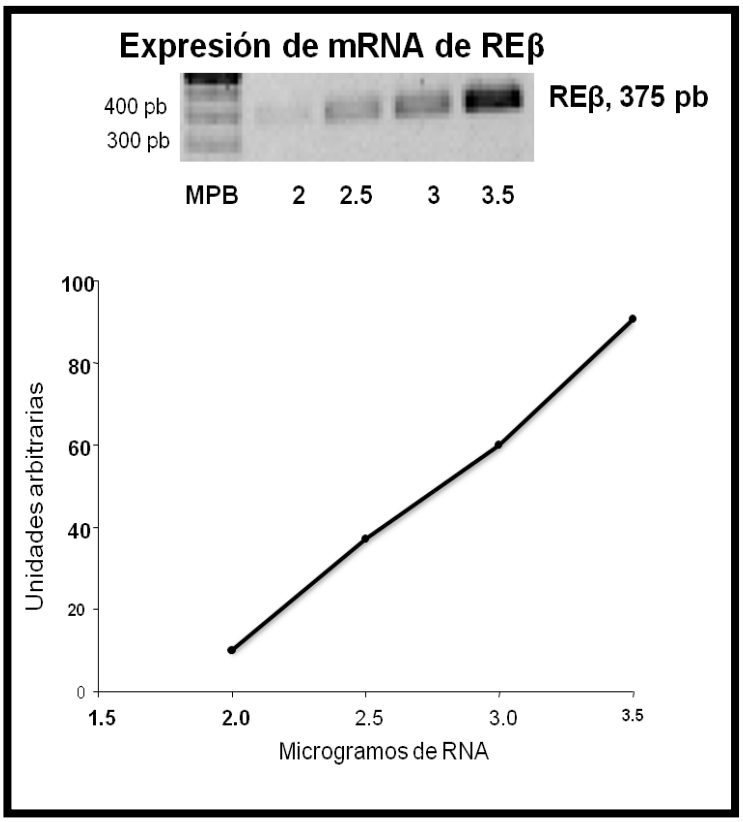

Figura 8. RT-PCR para REβ, 1 = MPB; 2= 2.0 µg; 3= 2.5 µg; 4= 3.0 µg; 5= 3.5 µg de ARN; 50 pM de oligonucleótido y 10µL de ADNc.

9.4 E centraciones de PR

Se determinó la expresión del ARNm del REβ en el cultivo de células LNCaP tratadas con PRL por 30 minutos a concentraciones de: 5, 10, 25, 50,100 y 200 nM. Para comparar la expresión del receptor, se utilizó una ANOVA de 1 vía para muestras independientes y la prueba *pos hoc* de Fisher LSD. No se observaron diferencias significativas entre las concentraciones de 10, 25, 50 y 100 nM ($p<0.01$). En la figura 8 se muestra la expresión del ARNm de REβ a distintas concentraciones de PRL.

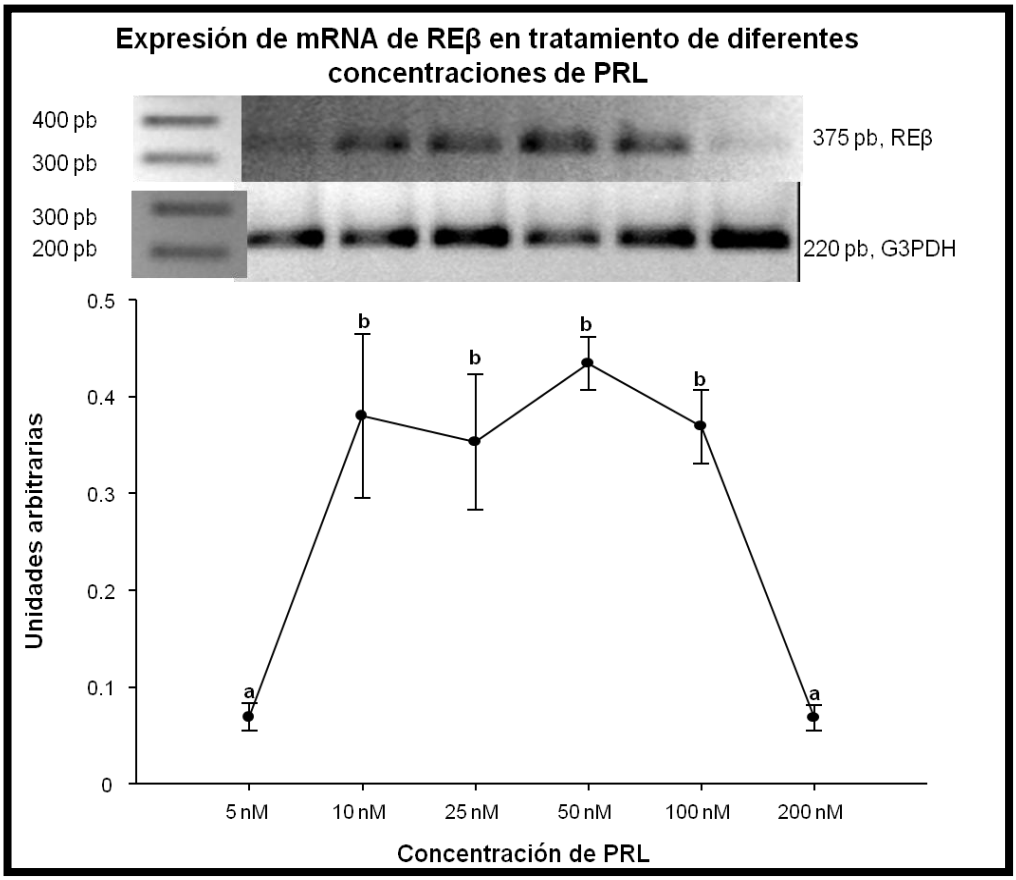

Figura 9. Expresión de ARNm de REβ en el tratamiento con dosis variables de PRL. Se muestran los promedios de 4 experimentos independientes ± el error estándar. Las diferencias se determinaron mediante ANOVA de 1 vía y la prueba *post hoc* de Fisher LSD. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas, con $p<0.01$. La prueba Fisher LSD mostró que la expresión del receptor incrementa cuando se utilizan concentraciones a partir de 10 y va hasta 100 nM, la expresión observada en este intervalo de concentraciones no mostraron diferencias significativas. Por otro lado la expresión observada utilizando la concentración de 200nM , tampoco es estadísticamente diferente de la observada a la concentración de 5nM.

En la presente tesis se analizó la influencia de PRL por 30 minutos, en concentraciones de 5, 10, 25, 50, 100 y 200 nM en la expresión del ARNm de REβ en cultivos celulares de la línea celular LNCaP, hasta el momento no existen estudios donde se evalúe el efecto de PRL en la expresión del REβ en próstata. Sin embargo, dicho efecto es posible puesto que las células LNCaP poseen los mismos receptores que en cuerpo lúteo, pituitaria y glándula mamaria (Horoszewicz et al., 1983).

En el presente trabajo se observó que aumenta la expresión del REβ a concentraciones de 10 a 100 nM, lo cual demuestra la regulación prolactínica en la expresión del REβ en células prostáticas, además, concuerda con lo encontrado en pituitaria, cuerpo lúteo y glándula mamaria (Frasor et al., 2001a; Telleria et al., 1998)

En pituitaria, se observó mediante la técnica de RT-PCR que la expresión del ARNm del REβ, se mantenía en niveles constantes durante la gestación, disminuyendo significativamente en el parto. Al realizar hipofisectomía la cual consiste en retirar la hipófisis (encargada de la regulación de la secreción de PRL), se disminuía la expresión del REβ, restablecíiendose los niveles mediante la administración de PRL (Frasor et al., 2001a).

En la línea celular CG-CL, se evaluó la expresión del REβ en presencia de PRL, encontrando una respuesta dosis-dependiente (Tellería et al., 1998).

En glándula mamaria se observa una inhibición de la expresión del REβ, puesto que el tratamiento con E_2, fosforila a las proteínas STAT las cuales, al fosforilizarse impiden la dimerización de estas proteínas y su traslocación a núcleo, donde ejercen su función como factores de la transcripción (Frasor et al., 2001).

La regulación que ejerce PRL en la expresión del REβ se cree que es mediada por vías de activación como las MAPK , las cuales son un mecanismo de transducción intracelular que se activa cuando PRL se une a su receptor, este mecanismo también está asociado a la función que realiza PRL sobre el crecimiento y funcionamiento prostático (Pascual et al., 2009).

Otra vía de señalización activada por PRL es la via Jak/Stat, cuyo mecanismo de acción se inicia cuando PRL se une a su receptor, lo que provoca la dimerización del mismo, con cambios conformacionales en el dominio citoplasmático, estos cambios activan a la proteína Jak, la cual posee actividad tirosina cinasa. Cuando en el dominio citoplasmático son fosforiladas las proteínas Jak, se convierten en sitios de anclaje para las para las STAT, las cuales son reclutadas posteriormente y fosforiladas por las proteínas Jak. Al encontrarse fosforilada la STAT se une a otra proteína STAT (la cual se encuentra también fosforilada), al formar ese dímero, este se trasloca al núcleo para activar la transcripción (Locia et al., 2013).

Existen isoformas de las proteínas STAT, de las cuales se sabe que también están implicadas en la regulación de la expresión del REβ en influencia de PRL, ejemplo de ello es la STAT3, la cual participa como factor de la transcripción, la cual es activada por la participación de Src y P13K (Neilson et al., 2007).De este modo la via Jak/ Stat podría aumentar la expresión celular a HPB mediante la actuación de una de las isoformas de la proteína Stat.

Con respecto a la razón por lo cual PRL aumenta la expresión del REβ, puede mencionarse lo siguiente, que si bien en cierto que el REβ es un inhibidor de la proliferación, en etapas avanzadas como la metástasis ya no tiene esta función, lo cual concuerda con el papel que se atribuye a PRL como inductor de la proliferación y carcinogénesis prostática, aunado a esto, es significativo que PRL se encuentra elevada en hombres con cáncer prostático metastásico y en general incrementa con la edad (Horvath et al., 2001), sugiriendo un papel importante a las patologías prostáticas, por lo tanto, en células cancerosas metastásica prostáticas, PRL podría incrementar la expresión de REβ para promover la supervivencia de las mismas, por lo tanto en el presente trabajo se concluye que en células prostáticas también se presenta la regulación del REβ mediada por PRL.

11. CONCLUSIONES

- La cantidad de ARN total óptima para realizar la técnica de RT-PCR en línea celular (LNCaP), fue de 2.5 µg y el número de amplificaciones fue de 30 ciclos con 50 pM de oligonucleótido.
- El estímulo de PRL a 30 minutos aumenta la expresión del REβ en (LNCaP) a partir de la concentración de 10 nM y se mantiene la expresión hasta 100 nM.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Bardin A, Boulle N, Lazennec G, Vignon, F, Pujol P. Loss of ERbeta expression as a common step in estrogen-dependent tumor progression. Endocr-Relat Cancer 2004 11: 537-51.

2. Beato M, Klug J. Steroid hormone receptors: an update. Hum Reprod Update 2000 6: 225-36.

3. Bole-Feysot C, Goffin V, Edery M, Binart N, Kelly PA. Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. Endocr Rev 1998 19: 225-268.

4. Bonkhoff H, Berges R. The evolving role of oestrogens and their receptors in the development and progression of prostate cancer. Eur Urol 2009 55: 533-4.

5. Castelán F. Fluctuaciones de la prolactina producida por la conducta sexual y su regulación por hormonas esteroides en la rata macho. Xalapa, Veracruz, México, Instituto de Neuroetología, Universidad Veracruzana 2000 1-64.

6. Castellon E, Venegas K, Saenz L, Contreras H, y Huidobro C. Secretion of prostatic specific antigen, proliferative activity and androgen response in epithelial-stromal co-cultures from human prostate carcinoma. Int. J. Androl 2005 28: 39-46.

7. Chu MC, Mor G, Lim C, Zheng W, Parkash V, Schwartz PE. Low-grade endometrial stromal sarcoma: hormonal aspects. Gynecol Oncol 2003 90(1), 170-176.

8. Dupont SA, Krust. Effect of single and compound knockouts of estrogen receptors alpha (ERalpha) and beta (ERbeta) on mouse reproductive phenotypes. Development 2000 127: 4277-4291.

9. Enmark E, y Gustafsson JA. Oestrogen receptors - an overview. J Intern Med 1999 246: 133-138.

10. Frasor J, Barkai U, Zhong L, Fazleabas AT, Gibori G. PRL-induced ERalpha gene expression is mediated by Janus kinase 2 (Jak2) while signal transducer and activator of transcription 5b (Stat5b) phosphorylation involves Jak2 and a second tyrosine kinase. Mol Endocrinol 2001b 15: 1941-52.

11. Frasor J, Park K, Byers M, Telleria C, Kitamura T, Yu-Lee LY, Djiane J, Park- Sarge OK, Gibori G. Differential roles for signal transducers and activators of transcription 5a and 5b in PRL stimulation of ERalpha and ERbeta transcription. Mol Endocrinol 2001a 15: 2172-81.

12. Freeman ME, Kanyicska B, Lerant, A, y Nagy G. Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. Physiol Rev. 2000 80:523-1631.

13. Gruber CJ, Gruber DM, Gruber IM, Wieser F, Huber JC. Anatomy of the estrogen response element. Trends Endocrinol Metab 2004 15: 73-8.

14. Harris HA. Estrogen receptor-beta: recent lessons from in vivo studies. Mol Endocrinol 2007 21: 1-13.

15. Horoszewicz JS. LNCaP model of human prostatic carcinoma. Cancer Res 1983 43:1809-18.

16. Horvath LG, Henshall SM. Frequent loss of estrogen receptor-beta expression in prostate cancer. Cancer Res 2001 61: 5331-5335.

17. Huang WJ, Yeh JY, Tsai SC, Lin H, Chiao YC, Chen JJ, Lu CC., Hwang SW, Wang SW, Chang LS, y Wang PS. Regulation of testosterone secretion by prolactin in male rats. J. Cell Biochem 1999 74: 111-118.

18. Kawashima H y Nakatani T. Involvement of estrogen receptors in prostatic diseases. Int J Urol 2012 19: 512-22.

19. Koehler KF, Helguero LA, Haldosen LA, Warner M, Gustafsson JA. Reflections on the discovery and significance of estrogen receptor beta. Endocr Rev 2005 26: 465- 78.

20. Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Haggblad J, Nilsson S, Gustafsson JA. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. Endocrinology 1997 138: 863-70.

21. Kuiper GG, Enmark E, Pelto-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. Proc Natl Acad Sci U S A 1996 93: 5925-30.

22. Lau KM, LaSpina M, Long J, Ho SM. Expression of estrogen receptor (ER)- alpha and ER-beta in normal and malignant prostatic epithelial cells: regulation by methylation and involvement in growth regulation. Cancer Res 2000 60: 3175-82.

23. Lindberg MK, Moverare S, Skrtic S, Gao H, Dahlman-Wright K, Gustafsson JA, Ohlsson C. Estrogen receptor (ER)-beta reduces ERalpha-regulated gene transcription, supporting a "ying yang" relationship between ERalpha and ERbeta in mice. Mol Endocrinol 2003 17: 203-8.

24. Liu MM, Albanese C, Anderson CM, Hilty K, Webb P, Uht RM, Price RH, Jr., Pestell RG, Kushner PJ. Opposing action of estrogen receptors alpha and beta on cyclin D1 gene expression. J Biol Chem 2002 277: 24353-60.

25. Locia J, Hernandez ME, Aranda GE, Rojas F, Manzo J, Coria GA, Yerena CE, Soto AE. El papel de los estrógenos y sus receptores en la prevención y promoción de enfermedades proliferativas. ReveNeurobioogia 2013 4(8) 300-813.

26. Maggiolini M, Recchia AG, Carpino A, Vivacqua A, Fasanella G, Rago V, Pezzi V, Briand PA, Picard D, Ando S. Oestrogen receptor beta is required for androgenstimulated proliferation of LNCaP prostate cancer cells. J Mol Endocrinol 2004 32: 777-91.

27. McPherson SJ, Ellem SJ, Simpson ER, Patchev V, Fritzemeier KH, Risbridger GP. Essential role for estrogen receptor beta in stromal-epithelial regulation of prostatic hyperplasia. Endocrinology 2007 148: 566-74.

28. Morani A, Warner M, Gustafsson JA. Biological functions and clinical implications of oestrogen receptors alfa and beta in epithelial tissues. J Intern Med 2008 264: 128-42.

29. Neill JD, y Nagy GM. Prolactin secretion and its control. In The physiology of reproduction. (E.Knobil and J.D.Neill, Eds.) Raven Press, New York 1994 Second Edition ed., pp. 1833-1860.

30. Neilson LM, Zhu J , Xie J, Malabarba MG, Sakamoto K, Wagner KU. Coactivation of janus tyrosine kinase (Jak)1 positively modulates prolactin-Jak2 signaling in breast cancer: recruitment of ERK and signal transducer and activator of transcription (Stat)3 and enhancement of Akt and Stat5a/b pathways. Mol Endocrinol 2007 21(9), 2218-2232.

31. Nevalainen MT, Valve EM, Ingleton PM, Nurmi M, Martikainen, PM, y Harkonen, PL. Prolactin and prolactin receptors are expressed and functioning in human prostate J. Clin. Invest 1997 99: 618-627.

32. Nilsson S, Makela S, Treuter E, Tujague M, Thomsen J, Andersson G, Enmark E, Pettersson K, Warner M, Gustafsson JA. Mechanisms of estrogen action. Physiol Rev 2001 81: 1535-65.

33. Nilsson S y Gustafsson JA. Biological role of estrogen and estrogen receptors. Crit Rev Biochem Mol Biol 1999 37: 1-28.

34. Ouhtit A, Morel G, y Kelly PA. Visualization of gene expression of short and long forms of prolactin receptor in the rat. *Endocrinology* 1993 133:135-144.

35. Ouhtit A, Morel G, Kelly PA. Visualization of gene expression of short and long forms of prolactin receptor in rat reproductive tissues. Biol Reprod 1993 49: 528-36.

36. Pandini G, Genua M, Frasca F, Squatrito S, Vigneri R, Belfiore A. 17beta-estradiol upregulates the insulin-like growth factor receptor through a nongenotropic pathway in prostate cancer cells. Cancer Res 2007 67: 8932-41.

37. Pascual LI, Manzo D, Goffin V, Kessal K, Aranda G, Estudillo C. Prolactina: Mecanismos intracelulares involucrados en la función prostática. Revista Médica de la Universidad Veracruzana 2009 9(1), 36-40.

38. Perrot-Applanat M, Gualillo O, Buteau H, Edery M, y Kelly PA. Internalization of prolactin receptor and prolactin in transfected cells does not involve nuclear translocation. J. Cell Sci 1997 110: 1123-1132.

39. Prins GS, Huang L, Birch L, Pu Y. The role of estrogens in normal and abnormal development of the prostate gland. Ann NY Acad Sci 2006 1089: 1-13.

40. Ricke WA, McPherson SJ, Bianco JJ,Cunha GR, Wang Y, Risbridger GP. Prostatic hormonal carcinogenesis is mediated by in situ estrogen production and estrogen receptor alpha signaling. FASEB J 2008 22: 1512-20.

41. Roger P, Sahla ME, Makela S, Gustaffson JA, Baldet P,Rochefort H. Decreased expression of estrogen receptor beta protein in proliferative preinvasive mammary tumors. Cancer Res 2001 61(6), 2537-2541.

42. Ross MH y Pawlina W. *Histología.* Texto y atlas color con biología celular y molecular (J. Horacio-Negrete, Trans. 5° ed.). Argentina: Editorial Médica Panamericana 2007.

43. Sabbah M, Radanyi C, Redeuilh G, Baulieu EE. The 90 kDa heat-shock protein (hsp90) modulates the binding of the oestrogen receptor to its cognate DNA. Biochem J 1996 314:1 205-13.

44. Scordalakes EM, Imwalle DB, Rissman EF. Oestrogen's masculine side: mediation of mating in male mice. Reproduction 2002 124: 331-8.

45. Takahashi Y, Perkins SN, Hursting SD, Wang TT. 17beta-Estradiol differentially regulates androgen-responsive genes through estrogen receptor-beta- and extracellular-signal regulated kinasedependent pathways in LNCaP humanprostate cancer cells. Mol Carcinogen 2007 46: 117-29.

46. Taylor RA, Cowin P, Couse JF, Korach KS, Risbridger GP. 17beta-estradiol induces apoptosis in the developing rodent prostate independently of ERalpha or ERbeta. Endocrinology 2006 147: 191- 200.

47. Telleria CM, Zhong L, Deb S, Srivastava RK, Park KS, Sugino N, Park-Sarge OK, Gibori G. Differential expression of the estrogen receptors alpha and beta in the rat corpus luteum of pregnancy: regulation by prolactin and placental lactogens. Endocrinology 1998 139: 2432.

48. Tessier C, Deb S, Prigent-Tessier A, Ferguson-Gottschall S, Gibori GB, Shiu RP, Gibori G. Estrogen receptors alpha and beta in rat decidua cells: cell-specific expression and differential regulation by steroid hormones and prolactin. Endocrinology 2000 141: 3842-51.

49. Van Coppenolle F, Slomianny C, Carpentier F, Le B, X Ahidouch A, Croix D, Legrand G, Dewailly E, Fournier S, Cousse H, Authie D, Raynaud JP, Beauvillain JC, Dupouy JP, y Prevarskaya N. Effects of hyperprolactinemia on rat prostate growth: evidence of androgeno-dependence. Am. J. Physiol *Endocrinol. Metab* 2001 280: E120-E129.

50. Wang JM, Irwin RW, Brinton RD. Activation of estrogen receptor alpha increases and estrogen receptor beta decreases apolipoprotein E expression in hippocampus in vitro and in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A 2006 103: 16983-8.

51. Weihua Z, Lathe R, Warner M, Gustafsson JA. An endocrine pathway in the prostate, ERbeta, AR, 5alphaandrostane- 3beta,17beta-diol, and CYP7B1, regulates prostate growth. Proc Natl Acad Sci U S A 2002 99: 13589-94.

52. Weihua Z, Makela S, Andersson LC, Salmi S, Saji S, Webster JI, Jensen EV, Nilsson S, Warner M, Gustafsson JA. A role for estrogen receptor beta in the regulation of growth of the ventral prostate. Proc Natl Acad Sci U S A 2001 98: 6330-5.

53. Zhao C, Dahlman-Wright K, Gustafsson JA. Estrogen receptor beta: an overview and update. Nucl Recept Signal 2008 6:e003.

54. Zhu X, Leav I, Leung YK, Wu M, Liu Q, Gao Y, McNeal JE, Ho SM. Dynamic regulation of estrogen receptor-beta expression by DNA methylation during prostate cancer development and metastasis. Am J Pathol 2004 164: 2003-12.