

## EFFECTOS DEL ESTRADIOL A TRAVÉS DEL RECEPTOR ESTROGÉNICO BETA SOBRE LA PROLIFERACION CELULAR ADENOHIPOFISARIA

Pablo Aníbal Pérez (1), Ignacio Agustín Wagner (1), Alicia Inés Torres (1), Silvina Gutiérrez (1).

(1) Centro de Microscopía Electrónica, INICSA-CONICET. Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba. Córdoba. Argentina.  
silvinagutierrezoschmann@gmail.com

Los niveles de 17 $\beta$ -estradiol (E<sub>2</sub>) fluctúan en el ciclo estral, preñez y lactancia modulando la población celular adenohipofisaria para adecuarla a los requerimientos hormonales del organismo. Estos efectos son mediados por sus receptores estrogénicos específicos (RE)  $\alpha$  y  $\beta$ , ambos presentes en adenohipófisis. En nuestro laboratorio se estudia desde hace varios años los efectos del E<sub>2</sub> a través del RE $\alpha$ , el cual sería el principal responsable de las acciones de los estrógenos, conociéndose muy poco sobre los efectos del RE $\beta$  en la adenohipófisis. Este subtipo está presente en la glándula ya que se ha detectado el ARNm y la proteína en el 20% de las células endocrinas adenohipofisarias. Se ha sugerido que participaría en la regulación de la secreción de prolactina [1] y se ha observado que en ratones hembra la pérdida del RE $\beta$  indujo el desarrollo de grandes tumores hipofisarios [2]. Estos antecedentes inducen a investigar la expresión del RE $\beta$  en situaciones fisiológicas y patológicas adenohipofisarias y analizar su implicancia funcional en esta glándula. Para llevar a cabo este objetivo se utilizaron ratas hembra Wistar en diferentes etapas del ciclo estral, células GH3 transfectadas para la sobre-expresión del RE $\beta$  (GH3 $\beta$ +) y un modelo de hipófisis hiperplásicas/adenomatosas inducido por la implantación de cápsulas de benzoato de estradiol por 20, 40 y 60 días. Se realizaron cultivos celulares estimulados con E<sub>2</sub> y con agonistas específicos de ambos subtipos de RE (PPT: agonista del RE $\alpha$  y DPN: agonista del RE $\beta$ ). Se determinó la expresión del RE $\beta$ , RE $\alpha$ , PTEN, ciclina D1 y p21 por microscopía electrónica, western blot, inmunofluorescencia y citometría de flujo. Se cuantificó la proliferación celular (BrdU) y el contenido de ADN (Ioduro de propidio). Análisis estadístico: test Anova-Tukey y Dunnet. En primer lugar se determinó la expresión y localización subcelular del RE $\beta$  durante el ciclo estral y en el desarrollo tumoral adenohipofisario. Se observó que en proestro el 35.4  $\pm$  2.5% de las células adenohipofisarias fueron RE $\beta$ +, en estro un 18.79  $\pm$  1.1 %, mientras que en diestro un 34.12  $\pm$  7.7 % de células expresaron el RE $\beta$ , indicando que la expresión del RE $\beta$  fluctúa durante el ciclo estral, con un descenso en estro. En el modelo hiperplásico/adenomatoso se detectó una disminución gradual de su expresión, junto a una caída significativa del supresor tumoral PTEN (Fig 1). Estos resultados fueron confirmados con western blot y cuantificados por citometría de flujo. Por microscopía electrónica se analizó la distribución subcelular del RE $\beta$ , observando partículas de oro coloidal en citosol libre, retículo endoplasmático rugoso, mitocondrias y en el núcleo (Fig 2). En segundo lugar se analizaron los efectos de la sobre-expresión del RE $\beta$  en la línea tumoral GH3 (GH3 $\beta$ ), con una inhibición significativa de la proliferación y del número de células en fase proliferativa, en comparación con GH3 transfectadas con el plásmido vacío (GH3 $\beta$ -). Esto fue acompañado de una disminución de la expresión de ciclina D1 y del RE $\alpha$ , tanto en GH3 $\beta$ + control como en las estimuladas con el agonista específico del RE $\beta$  (DPN). Además, se observó que la estimulación con DPN modificó la localización subcelular de p21, incrementando su expresión nuclear, sugiriendo que la estimulación del RE $\beta$  induce translocación de p21 al núcleo donde bloquea la progresión de la fase S del ciclo celular. Finalmente mediante microscopía electrónica utilizando una doble inmunomarcación con oro coloidal de 5 y 15 nm se identificaron ambas proteínas, RE $\beta$  y p21, solas o asociadas, a una distancia menor de 5 nm (Fig 3). Estos resultados fueron validados mediante ensayos de inmunoprecipitación. Estos resultados sugieren que el E<sub>2</sub> podría modular la expresión del RE $\beta$ , inhibiendo su expresión, debido a que el RE $\beta$  fluctúa durante el ciclo estral, con un descenso en estro, cuando los niveles de E<sub>2</sub> *in vivo* son altos y que la expresión del subtipo  $\beta$  cae significativamente durante el desarrollo tumoral inducido por la estimulación estrogénica crónica. Además, los resultados evidencian que el RE $\beta$  podría ejercer un rol inhibitorio sobre la proliferación celular adenohipofisaria, con participación de ciclina D1 y p21 y mediante la inhibición de la expresión del RE $\alpha$ .

### REFERENCIAS

## 4° Congreso de la Asociación Argentina de Microscopía (SAMIC 2016)

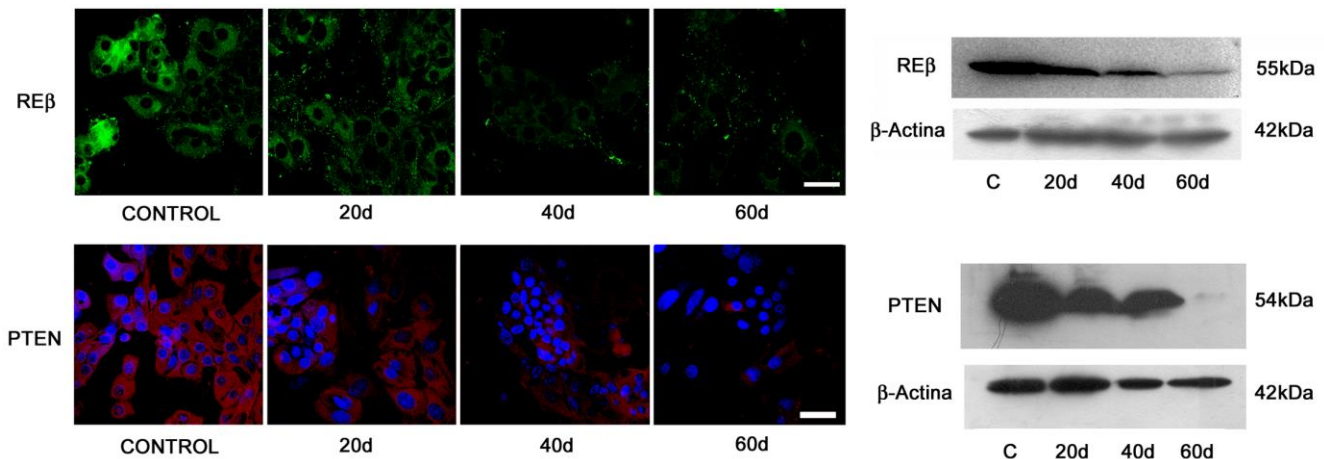
[1] Mitchner, N.A., Garlick, C., Steinmetz, R.W. and Ben-Jonathan, N., (1999) "Differential regulation and action of estrogen receptors alpha and beta in GH3 cells" *Endocrinology* 140(6): 2651-2658.

[2] Fan X, Gabbi C, Kim HJ, Cheng G, Andersson LC, Warner M, Gustafsson JA, (2010) "Gonadotropin-positive pituitary tumors accompanied by ovarian tumors in aging female ER $\beta$ <sup>-/-</sup> mice" *Proc Natl Acad Sci USA* 107 (14): 6453-6458.

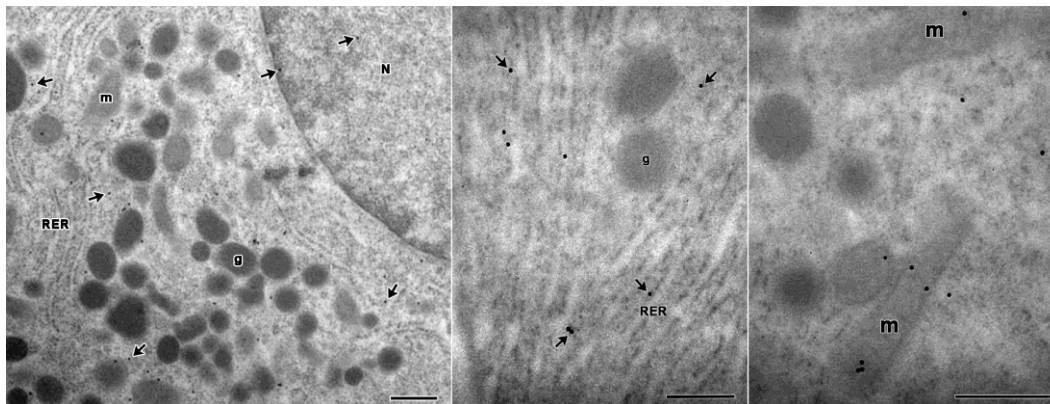
## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Centro de Microscopía Electrónica, INICSA-CONICET, FCM, UNC por el uso de las facilidades y a SECyT (UNC), CONICET y FONCyT-ANPCyT que proveyeron financiación.

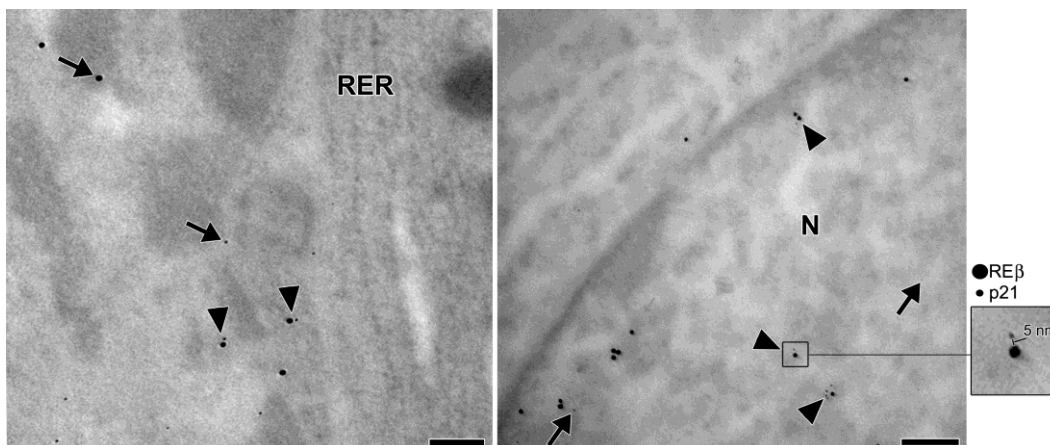
## FIGURAS



**Figura 1.** Expresión del RE $\beta$  y del supresor tumoral PTEN durante el desarrollo hiperplásico/adenomatoso experimental. Barra= 20  $\mu$ m.



**Figura 2.** Inmunolocalización del RE $\beta$  (flechas) en citosol libre, retículo endoplasmático rugoso (RER), mitocondrias (m) y núcleo (N) de células adenohipofisarias normales. g: gránulos. Barra= 1  $\mu$ m.



**Figura 3.** Inmunomarcación para RE $\beta$  (15 nm) y p21 (5 nm) de una célula adenohipofisaria normal tratada con DPN. Ambas proteínas fueron encontradas solas (flechas) o en proximidad (puntas de flechas) en el citoplasma y en el núcleo (N). RER: retículo endoplasmático rugoso. Barra= 0.2  $\mu$ m.