



Resumen #93

p21 como mediador de los efectos del RE β en adenohipófisis

1Pérez PA, 1Sabatino ME, 1Petiti JP, 1Wagner IA, 1De Paul AL, 1Torres AI, 1Gutierrez S
1Centro de Microscopía Electrónica, Facultad de Medicina, INICSA-CONICET.

Área: Básica

Resumen:

El estradiol (E2) actúa a través de sus receptores estrogénicos (RE) α y β , presentes en adenohipófisis. Se ha demostrado que el RE α modula la expresión de p21, un regulador crucial del ciclo celular. Esta proteína ejerce efectos diferenciales dependientes de su localización subcelular, en citoplasma promueve la proliferación mientras que en núcleo causa arresto del ciclo celular. Resultados previos de nuestro grupo han demostrado que el RE β inhibe la proliferación celular adenohipofisaria, desconociéndose los mecanismos moleculares involucrados. Considerando estos antecedentes nos propusimos dilucidar si p21 está involucrado en los efectos del estradiol mediados por el RE β sobre las células adenohipofisarias.

Cultivos primarios de células adenohipofisarias de ratas Wistar hembras (n=5) fueron estimulados por 72h con E2 o con agonistas específicos del RE α (PPT) y del RE β (DPN) y procesados para la determinación de la expresión de p21 en fracción nuclear y citoplasmática por Western blot (WB) y la localización subcelular por inmunofluorescencia (IF). Se realizaron ensayos de inmunoprecipitación (IP) y doble inmunocitoquímica ultraestructural de RE β y p21 por microscopía electrónica de transmisión (MET). Todos los ensayos se realizaron 3 veces de manera independiente y los resultados fueron analizados estadísticamente (test ANOVA-Tuckey, p<0.05).

Mediante IF se observó localización citoplasmática de p21 en células adenohipofisarias controles y tratadas con E2 o PPT, mientras que DPN fue el único estímulo capaz de incrementar la inmunomarcación nuclear. Este resultado fue corroborado por WB, donde se evidenció expresión de p21 en la fracción citoplasmática en controles y tratados con E2 o PPT, mientras que DPN incrementó significativamente la expresión de p21 en la fracción nuclear, con un descenso en la fracción citoplasmática. Por MET la doble inmunomarcación para p21 y RE β con partículas de oro coloidal de 5nm y 15nm respectivamente mostró la presencia de partículas de oro aisladas o asociadas a una distancia inferior a 5nm entre ellas. Los ensayos de IP de p21 endógeno muestran la presencia del RE β .

Estos resultados sugieren una interacción funcional entre el RE β y p21. La activación del RE β por su agonista específico induciría probablemente translocación nuclear de p21, ejerciendo un rol supresor del ciclo celular en adenohipófisis.

Palabras Clave: RECEPTOR ESTROGENICO BETA, p21, ADENOHIPOFISIS, Proliferación Celular

Abstract #93

p21 as mediator of the ER β effects on pituitary gland

1Pérez PA, 1Sabatino ME, 1Petiti JP, 1Wagner IA, 1De Paul AL, 1Torres AI, 1Gutierrez S

1Centro de Microscopía Electrónica, Facultad de Medicina, INICSA-CONICET.

Abstract:

Estradiol (E2) acts through estrogen receptors (ER) α and β , both present in adenohypophysis. It has been shown that the ER α modulates the expression of p21, a critical regulator of the cell cycle. This protein exerts differential effects depending on its subcellular localization. In cytoplasm p21 promotes proliferation while nuclear p21 induce cell cycle arrest. Previous results from our group have shown that ER β inhibits pituitary cell proliferation, but the molecular mechanisms involved in this effect are unknown. Considering this background, we decided to determine whether p21 is involved in the effects of estradiol mediated by the ER β on anterior pituitary cells.

Primary cultures of anterior pituitary cells obtained from female Wistar rats (n = 5) were stimulated for 72h with E2 or ER α (PPT) and ER β (DPN) specific agonists and processed for the determination of the p21 expression in nuclear and cytoplasmic fraction by Western blot (WB) and the subcellular localization by immunofluorescence (IF). Immunoprecipitation assays (IP) and double ultrastructural immunocytochemistry for ER β and p21 on transmission electron microscopy (TEM) were made. All assays were performed 3 independent times and the results were statistically analyzed (ANOVA - Tukey test, p < 0.05).

Using IF, cytoplasmic localization of p21 was observed in controls and anterior pituitary cells treated with E2 or PPT, while DPN was the only stimulus capable of increasing nuclear immunostaining. This result was confirmed by WB, where p21 expression was present in the cytoplasmic fraction of controls and treated with E2 or PPT, while DPN significantly increased the expression of p21 in the nuclear fraction with a decrease in the cytoplasmic fraction. TEM double immunostaining with 5nm and 15nm colloidal gold particles for p21 and ER β respectively showed the presence of gold particles isolated or associated with a distance of less than 5 nm between them. IP test for endogenous p21 showed the presence of ER β .

These results suggest a functional interaction between p21 and ER β . The ER β activation by their specific agonist probably induce nuclear translocation of p21, exerting a suppressor role in adenohypophysis cell cycle.

Keywords:

ESTROGEN RECEPTOR BETA, p21, pituitary gland, CELLULAR PROLIFERATION