

## Veterinaria México

Volumen 36  
Volume

Número 4  
Number

Octubre-Diciembre 2005  
October-December

*Artículo:*

Relación entre estructura y función de  
receptores para hormonas esteroideas:  
Receptores estrogénicos

Derechos reservados, Copyright © 2005:  
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM

Otras secciones de  
este sitio:

- 👉 Índice de este número
- 👉 Más revistas
- 👉 Búsqueda

*Others sections in  
this web site:*

- 👉 *Contents of this number*
- 👉 *More journals*
- 👉 *Search*

## Relación entre estructura y función de receptores para hormonas esteroideas: Receptores estrogénicos

### Relationship between structure and function of receptors for steroid hormones: Estrogen receptors

Juan José Pérez-Rivero\* Álvaro Aguilar-Setién\*\* Alejandro Villa-Godoy\*\*\* Héctor Serrano†

#### Abstract

Functions exerted by estrogens in animal reproduction are tuned delicately by various mechanisms, among them, specific receptors for estrogens are paramount. Recently developed techniques for biochemical and genetic molecular studies led to the discovery of the modular structure of the nuclear receptors. A notorious group of this type of receptors is the estrogen-receptor family (ER). Each module has a unique structural composition that allows interaction with a variety of molecules. As a result of this interaction between the receptor and the molecules, several effects are elicited, some of them are inhibitory while others are stimulatory of the transcription rate. Indeed, some of the reactions resulting from a synthetic ligand-receptor interaction are as unexpected as the conformational change of the ER three-dimensional structure, allowing the ER itself to exert functions that are not described in the classical review articles on this topic. In the present review, we established a connection among structure, function and regulatory mechanisms of the nuclear receptors, emphasizing the ER, to make this information available to a broad spectrum of readers.

**Key words: NUCLEAR RECEPTOR, ESTROGEN RECEPTOR, LBD, DBD.**

#### Resumen

La exquisita regulación de la función ejercida por los estrógenos en diversos aspectos de la reproducción animal, se debe básicamente a los receptores con los que interactúan en los órganos blanco. El uso de técnicas moleculares bioquímicas y de genética ha permitido dilucidar la estructura modular de los receptores nucleares, entre los que se encuentran los estrogénicos. Cada módulo del receptor tiene características estructurales particulares que le permiten interactuar con una diversidad de moléculas. Como resultado de la interacción entre el receptor y diversas moléculas, desencadena efectos tan diferentes como una inhibición de la acción hormonal, hiperactivación de ésta, reflejada en el aumento en la tasa de transcripción de genes específicos o, incluso, reacciones inesperadas resultantes de la interacción con compuestos sintéticos que presentan una estructura tridimensional reconocible por el receptor. Con esta interacción se puede alterar la propia estructura tridimensional del receptor, permitiéndole ejercer funciones no descritas en los artículos recapitulativos clásicos. En esta revisión hemos establecido una correlación entre la estructura, función y regulación de los receptores nucleares, en especial, los estrogénicos, para ofrecer de manera accesible estos aspectos.

**Palabras clave: RECEPTOR NUCLEAR, RECEPTOR DE ESTRÓGENOS, LBD, DBD.**

Recibido el 14 de octubre de 2004 y aceptado el 7 de abril de 2005.

\* Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D. F. Correo electrónico: jjperez1\_1999@yahoo.com y perivet@terra.com.mx

\*\* Unidad de Investigación Médica en Inmunología, Instituto Mexicano del Seguro Social, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Hospital de Pediatría, Avenida Cuauhtémoc 330, Col. Doctores, 06720, México, D. F.

\*\*\* Departamento de Fisiología y Farmacología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D. F.

†Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, Avenida Michoacán y Purísima s/n, Col. La Purísima, 09340, México, D. F., Tel.: 58084733, Correo electrónico hser@xanum.uam.mx

## Introduction

In the last ten years several investigation groups have produced a great deal of information related to protein structures that act as specific steroidal hormone receptors. Most of these advances have been published in English. Even though there are some review articles on the topic, none of them include the complex mechanisms that explain the way that these receptors work. Consequently, it is necessary to integrate the new information to make it easily available. The most relevant points about the interaction between the structure and function of nuclear receptors are included in the present paper, emphasizing the role of estrogen receptors.

The first step in hormone function is the interaction with a specific binding protein that may be located in the membrane or inside the cells of tissues where hormones have a physiologic action. In the target cells, there is a dynamic interaction between the hormone and the receptor, constantly binding and unbinding depending on the association and dissociation between them.

Since hormone concentrations in body fluids are relatively low, (picograms or nanograms), the receptor must have high affinity for the hormone, or several binding sites acting in synergy because the number of receptors is limited. Therefore, the hormone receptors and target tissue in cells can be saturated.

According to their solubility, there may be two groups of hormones: hydrosoluble, such as insulin, follicle-stimulating hormone, growth factors and differentiation-inducing factors, as well as many others that share their protein nature, although some are not exclusively made of amino acids but are combined with carbohydrates (follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone and thyroid stimulating hormone). The second group is made of liposoluble molecules, except for some hormones made of modified amino acids (thyroid hormones) and their basic structure is made of cyclopentane-perhydro-phenanthrene typical of cholesterol. Examples of the second group are progesterone, estradiol, testosterone and glucocorticoids.

Liposoluble hormones have direct access to the inner cell, crossing the plasma membrane to go to the cell nucleus. Estrogen receptors are members of the nuclear receptors superfamily, made of several families that have been named according to the hormone types to which they selectively bind. These subfamilies are the androgen receptors (AR), estrogens (ER), progestogens, (PR), glucocorticoids (GR), thyroid hormones (TR), retinoic acid (RXR) and orphan receptors (OR).<sup>1,2</sup>

The location of these receptors inside the cell is controversial. Some authors believe they are cyto-

## Introducción

Durante la última década varios grupos de investigadores han descrito un sinnúmero de conocimientos relacionados con las estructuras proteínicas que funcionan como receptores específicos de las hormonas esteroidales. La mayoría de estos avances han sido publicados en inglés. Si bien han aparecido algunos artículos recapitulativos sobre el tema, en ninguno se engloban los complejos mecanismos que explican el funcionamiento de los citados receptores. En este contexto, es necesario integrar la información generada y plasmarla de tal manera que facilite su estudio a los lectores. En la presente revisión se cree pertinente hacer una síntesis de los aspectos más relevantes de la relación entre la estructura y las funciones de los receptores nucleares, enfatizando lo referente a receptores estrogénicos.

El primer paso en la acción de una hormona es la interacción con una proteína de unión específica. Ésta puede estar situada en la membrana o en el interior de las células que componen los tejidos donde una hormona ejerce su efecto fisiológico. En las células blanco, la interacción que se lleva a cabo entre la hormona y el receptor es una acción dinámica de unión y separación continuas, que depende de las constantes de asociación y disociación entre ambas entidades.

Como consecuencia de que las concentraciones de hormonas en los fluidos corporales se encuentran en concentraciones relativamente bajas (del orden de los picogramos o nanogramos), el receptor debe tener gran afinidad para su hormona o varios sitios de unión que actúen sinérgicamente entre sí, puesto que el número de receptores es finito; por tanto, su población en una célula y tejido blanco es saturable.

De acuerdo con sus propiedades de solubilidad, se tienen dos grandes grupos de hormonas: las hidrosolubles, como la insulina, la hormona folículo-estimulante, los factores de crecimiento y los factores inductores de diferenciación, entre muchas otras que tienen en común su naturaleza proteínica; si bien algunas no están constituidas exclusivamente por aminoácidos, sino que se encuentran combinadas con carbohidratos (hormonas folículo-estimulante, luteinizante y estimulante de la tiroides). El segundo grupo que está integrado por moléculas liposolubles, con excepción de algunas hormonas constituidas por aminoácidos modificados (hormonas tiroideas), tiene la estructura básica del ciclopentano-perhidrofenantreno característico del colesterol. Ejemplos de estas últimas son progesterona, estradiol, la testosterona y glucocorticoides.

Las hormonas liposolubles tienen acceso directo al interior de la célula, atravesando la membrana plas-

plasmatic,<sup>3</sup> while others think they are located in the cell nucleus.<sup>4</sup> The term nuclear receptors is used in this review since, regardless of their location, when the binding takes place with the specific ligand, the ligand-receptor unit exerts its physiologic action in the nucleus.

### Structure and action of nuclear receptors

The structure of nuclear receptors is modular, mostly having four or five different modules or structures with specific functions. (Figure 1).

Experimental evidence shows that the amino terminal region allows the interaction with other transcription factors that are found in the A/B region.<sup>5</sup> This interaction is necessary for the receptor function. Site-specific mutagenesis studies have led to the detection of significant amino acid sequences that are important for activation of the receptor. It has been proven that in most of the nuclear receptors there are two domains for transcription activation. The first one, called t<sub>1</sub>, is typical of the GR and equivalent to type 1 of the transcription activator domain "TAF1" of the ER. This domain is found in the A/B region. The second domain, t<sub>2</sub> or "TAF2", is present in the E region of all the nuclear receptor families, including the two previously mentioned.<sup>6</sup>

Both domains work specifically. Unlike what happens with the constitutive gene expression of genes common in every cell type (also colloquially called *house keeping* genes), the DNA structure with specific nucleotide sequences that control the rate of RNA synthesis from the information contained in the promoter, is slightly different in the genes under the influence of nuclear receptors, as depicted in Figure 2. In the hexokinase gene promoter that controls sugar catabolism, a TATTAAT sequence is found called TATA box, located to the left of the site where the RNA synthesis begins. This signal is enough to make general transcription factors bind to it and, by means of protein-protein interactions, stabilize the binding of polymerase RNA.

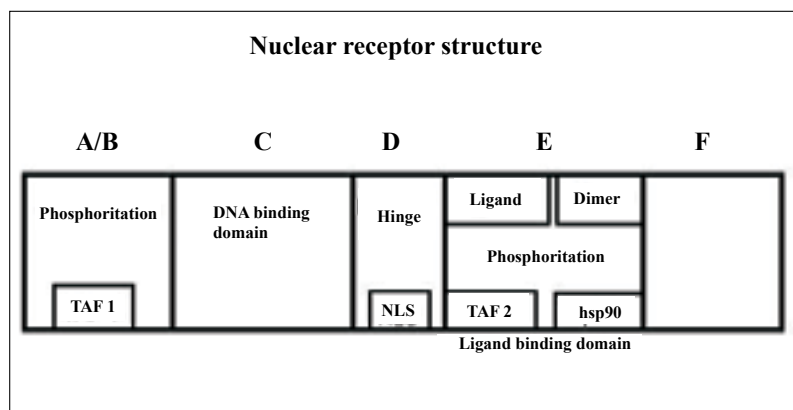
mática hasta alcanzar al núcleo celular. Los receptores estrogénicos son miembros de la superfamilia de receptores nucleares, integrada por varias familias, que han sido nombradas de acuerdo con los tipos de hormonas a las que se unen de manera selectiva. Estas subfamilias son los receptores para andrógenos (AR), estrógenos (ER), progestágenos (PR), glucocorticoides (GR), hormonas tiroideas (TR), de ácido retinoico (RXR) y receptores huérfanos (OR).<sup>1,2</sup>

La localización de estos receptores dentro de la célula es motivo de controversia; algunos autores apoyan el concepto de que dichos receptores son citoplasmáticos,<sup>3</sup> mientras que otros sostienen que se localizan en el núcleo.<sup>4</sup> En la presente revisión se utiliza el término receptores nucleares, ya que, independientemente de su localización, cuando éstos se unen con el ligando específico, la unidad ligando-receptor efectúa su acción fisiológica en el núcleo.

### Estructura y acciones de receptores nucleares

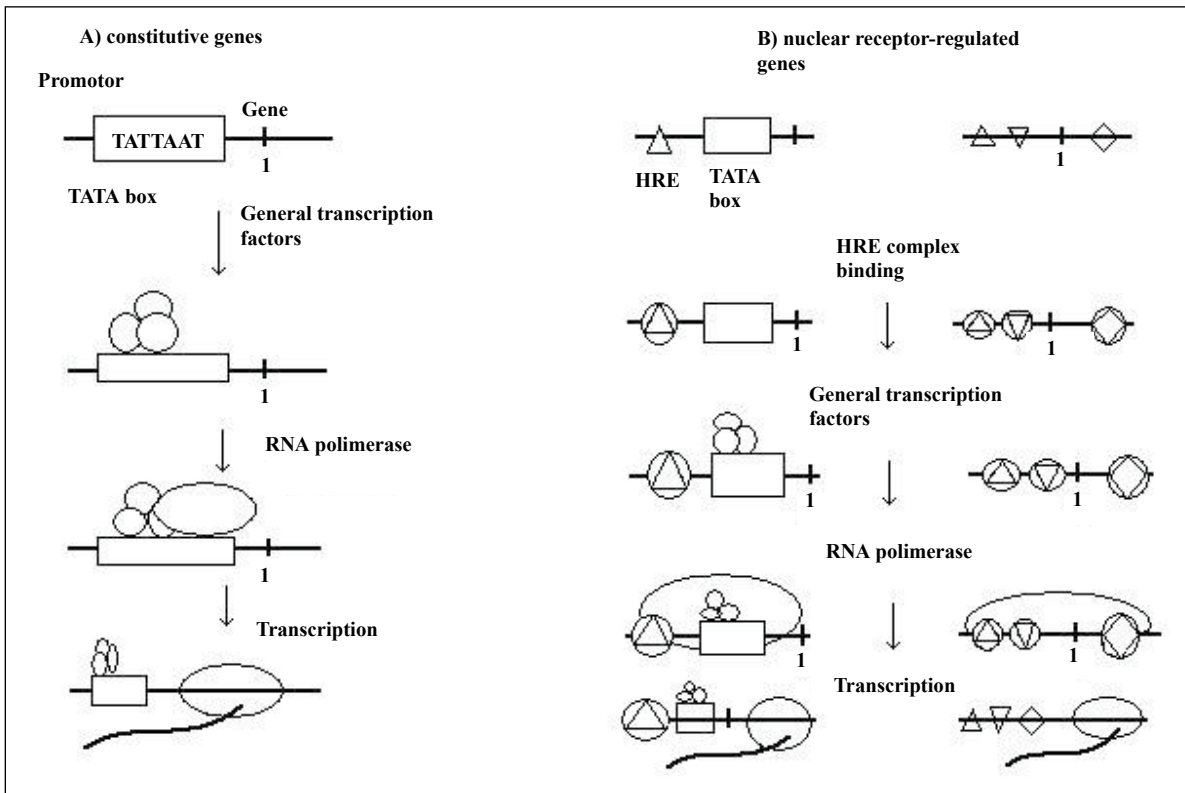
La estructura de los receptores nucleares es modular y la mayoría de ellos presentan cuatro o cinco diferentes módulos o estructuras con funciones específicas (Figura 1).

Las evidencias experimentales indican que la región aminoterminal permite la interacción del ligando con los factores de transcripción que se encuentran en la región A/B.<sup>5</sup> Esta interacción es necesaria para la acción del receptor. Estudios de mutagénesis sitio-específica han permitido la detección de secuencias de aminoácidos importantes para la activación del receptor. Se ha establecido que en la mayoría de los receptores nucleares existen dos dominios de activación de la transcripción: El primero, denominado t<sub>1</sub>, es característico de los GR y equivalente al tipo 1 del dominio activador de la transcripción, simbolizado "TAF1", de los ER. Este dominio se encuentra en la región A/B. El segundo dominio, el t<sub>2</sub> o "TAF2", se presenta en la región E de todas las familias de



**Figura 1.** Estructura de un receptor nuclear.

**Figure 1.** Structure of a nuclear receptor.



**Figura 2.** Comparación estructural entre los procesos de transcripción de genes de expresión constitutiva o *House keeping* y los “Regulados” por complejos hormona-receptor.

**Figure 2.** Structural comparison between *housekeeping* or constitutive expression gene transcription processes and those “regulated” by hormone-receptor complexes.

Conversely, in genes regulated by nuclear receptors, specific sequences called “response elements” arise, to which hormone-receptors bind to allow transcription of specific genes. The specific sequence that confers the hormone response element (HRE), as well as the relative concentration of receptors and hormones, results in a three-dimensional structure with greater or lesser transcription induction capacity.

The efficiency of induction is also different in the way it takes place. Cell cultures have shown that the TAF1 region can bind to a simple promoter, helping to bind the general transcription factors to the TATA box. The binding of TAF2 requires complex promoters where, besides HRE and TATA box, there are sequences recognized by other proteins that act as a big multiple protein complex recognized by polymerase RNA to start the transcription.<sup>1,2,5</sup>

The number and type of DNA sequences to which the receptors bind is also important. As already mentioned, sequences recognized by hormone-receptor complexes are generally called HRE. They are specifically named replacing the H in the first letter by the individual initial of the hormone in question: for

receptores nucleares, incluidos los dos antes mencionados.<sup>6</sup>

El funcionamiento de ambos dominios es específico. A diferencia de lo que ocurre con la expresión constitutiva de genes comunes a todo tipo de célula (denominados también coloquialmente como *house keeping*), la estructura de la región del ADN que tiene secuencias de nucleótidos específicas y que controlan la frecuencia con la que se sintetiza el ARN a partir de la información contenida en el ADN denominada promotor, en los genes controlados por los receptores nucleares se tiene una estructura ligeramente diferente, como se muestra en la Figura 2. En el promotor del gen de la hexocinasa, responsable del catabolismo de los azúcares, se presenta una secuencia TATTAAT, a la que se le denomina caja TATA, está localizada hacia la izquierda del sitio donde se inicia la síntesis del ARN. Esta señal es suficiente para que se unan a ella los factores generales de la transcripción y, mediante interacciones proteína-proteína, estabilizar la unión de la ARN polimerasa. Por el contrario, en los genes que están regulados por los receptores nucleares, se presentan secuencias específicas denominados “ele-

example, the ERE is the common abbreviation to recognize the response element to estrogen, while the GRE is the response element to glucocorticoids. *In vitro* experiments have shown that the binding of TAF1 to DNA requires several ERE copies to display maximal activity. Conversely, TAF2 acts with a decreased number of ERE.<sup>6</sup>

Two additional functions often attributed to the A/B region are the synergy of receptors and the selectivity of genes. Synergy occurs when the transcription in several HRE is activated resulting in a greater effect than the sum effect of the individual HRE. In GR, ER and PR, this synergy depends on the sequence and structure present in the t1/TAF1 region. With the different TAF1 and TAF2 regions, it is possible to activate different gene sequences, since they are capable of binding differently to similar sequences, and not exclusively and specifically to any given one.

The DNA *Binding Domain* or DBD is found in region C, structurally preserved in the nuclear receptors. The DBD is made by two zinc binding sites that establish covalent bonds coordinated with "cystein pairs", separated by ten to 15 amino acids. This structure has been called "zinc fingers". It is made of two  $\alpha$  helical portions, one at the beginning of each finger and extending beyond the fingers. The nearest portion to the amino terminal interacts with the deep helical groove to bind with the specific DNA sequence; while the end near the carboxy terminal, extends to the globular portion of the protein.<sup>7</sup>

Several structural variations have been found giving rise to a specific interaction. For example, at the cystein 9 level of the receptor for retinoic acid (RXR), there is an additional binding sequence to the DNA called "A box", located between amino acid 23 to 29 after the second zinc finger, that is, in the one closest to the carboxy terminal end.<sup>2</sup> "Box A" strengthens the DNA bond as it allows a greater structural stabilization of the DBD.<sup>1</sup> This region is not functional in GR and ER, even though it is present. However, possibly "box A" is necessary to stabilize the structure of these two receptors.

Along with region E, region D is a component of the carboxyl end terminal, whose main function is to act as a hinge, since it is located between the DNA or DBD bond and the ligand bond dominion (LBD).

Region D has a segment of amino acids with acid features, which is recognized by transporting proteins (NIF) allowing interaction with the pore complex components, through which the hormone-receptor complex is transported to the inner nucleus. This specific sequence has been called "nuclear location sequence" (NLS).<sup>8</sup>

Site specific mutagenesis and use of *knockout* organisms have shown that the amino acid sequence

mentos de respuesta", a los que se unen los complejos hormona-receptor para permitir que se transcriban los genes específicos. La secuencia específica que presenta el elemento de respuesta a la hormona (HRE), así como la concentración relativa tanto de receptores como de hormonas, resulta en una estructura tridimensional de mayor o menor capacidad inductora de la transcripción.

La eficiencia de la inducción varía igualmente en la manera en que se lleva a cabo. En cultivos celulares se ha demostrado que la región TAF1 puede actuar uniéndose a un promotor simple, auxiliando en la unión de los factores generales de la transcripción a la caja TATA; la unión de TAF2 requiere de promotores complejos en los que existen, además de HRE y caja TATA, secuencias reconocidas por otras proteínas que en conjunto actúan como un gran complejo multiproteínico reconocido por la ARN polimerasa para iniciar la transcripción.<sup>1,2,5</sup>

El número y tipo de secuencias de ADN al que se unen los receptores es también importante. Como ya se mencionó, las secuencias reconocidas por los complejos hormona-receptor son generalmente llamadas HRE, los cuales específicamente son nombrados reemplazando la H en la primera letra por la inicial particular de la hormona en cuestión; por ejemplo, el ERE es la abreviatura común para reconocer al elemento de respuesta al estrógeno, mientras el GRE es el elemento de respuesta a los glucocorticoides. En experimentos *in vitro*, se ha demostrado que la unión de TAF1 al ADN requiere varias copias del ERE para que pueda ejercer su actividad óptima. Por el contrario, la unión de TAF2 actúa con un número reducido de ERE.<sup>6</sup>

Otras dos funciones frecuentemente atribuidas a la región A/B son el sinergismo de receptores y la selectividad de los genes. El sinergismo se presenta cuando se activa la transcripción en varios HRE, siendo éste mayor que la suma del efecto de HRE individuales. En los GR, ER y PR, este sinergismo depende de la secuencia y estructura que se presente en la región t1/TAF1. Con las diferentes regiones TAF1 y TAF2 es posible activar distintas secuencias de genes, ya que son capaces de unirse de manera diferencial a secuencias similares y no exclusiva y específicamente a una determinada.

En la región C se encuentra el dominio de unión del ADN (DNA *Binding Domain* o DBD) que se encuentra conservado estructuralmente en los receptores nucleares. El DBD está formado por dos sitios de unión de zinc que establecen enlaces covalentes coordinados con dos pares de cisteína, separados por diez a 15 aminoácidos. A esta estructura se le ha denominado "dedos de zinc"; está constituida por dos porciones helicoidales, una al inicio de cada dedo y que



that allows binding to the hormone or ligand in a stereo-specific way to the receptor is found in region E.<sup>9</sup> This sequence belongs to the LBD dominion, that takes up most of the receptor and its two functions are associated, the first with the ligand binding, and the second with the specific protein interaction of more than one receptor type variant. As a result of the interaction with a specific receptor and sometimes with its variants, this dominion allows for the dimerization shown in Figure 3.<sup>1</sup> Equally, the hormone-receptor complex interaction with the TFIID, one of the general transcription factors, promotes a more efficient assembly of the transcription apparatus allowing mRNA synthesis. Finally, proteins also bind in this dominion, inducing a structural variation of the complex, especially heat shock proteins (hsp), which act as receptor stabilizing proteins that are waiting to bind to the ligand. Weihua *et al.*,<sup>11</sup> think that the terminal region of the receptor helps in the total structuring of the receptor itself, allowing stabilization of the ligand bond dominion and the protein interaction, leading to the distinction between agonist and antagonist substances of the ligand. This phenomenon only occurs in the ER, which is crucial for cell transcription regulation and treatment applications, as will be discussed further.<sup>1,12,13</sup> Region F only differs from region E in that it is not well preserved when a comparison is made in different vertebrates, for this reason, some authors consider E and F as one single region called E/F.<sup>14,15</sup>

The interaction of ER with other proteins such as protein p160 allows histone acetyl-transferase (HAT) to bind to this complex, leading to the modification of H1 histone of the nucleosomes so an activating complex in the ERE site is assembled. In this case, the p160 protein acts as coactivator of the transcription initiated by the ER. Even though the HAT interaction is not involved, the binding of the transcriptional activator protein (TRAP) to the ER leads to the modification of the nucleosomal complex of ERE, so the transcription machinery, including the polymerase II RNA, has a more efficient access. This type of ER-DNA regulation interaction is physiologically balanced with corepressors. The binding of Dax-1 protein allows attenuation of important gene transcription for male sex differentiation and spermatogenesis in mice perinatally treated with tamoxifen citrate. In this case, the ER-Dax 1 bond makes a complex that instead of allowing polymerase RNA interaction in the ERE sites, it is hindered, thus avoiding gene expression because there is no proper assembly.<sup>16</sup>

Although the process for which the function of receptors is described with detail, there are still some points that are analogically inferred from other models. In short, the first step for activation is the binding of the

se extiende más allá de ellos. La porción cercana a la región aminoterminal interactúa con el surco mayor helicoidal para unirse con la secuencia específica del ADN; mientras que el extremo cercano a la terminación carboxilo se continúa con la porción globular de la proteína.<sup>7</sup>

Asimismo, se han encontrado diversas variaciones estructurales que permiten una interacción específica. Por ejemplo, a nivel de la cisteína 9 del receptor para el ácido retinoico (RXR), existe una secuencia adicional de unión al ADN denominada “caja A”, localizada entre los aminoácidos 23 al 29 después del segundo “dedo de zinc”; es decir, al más próximo a la terminal carboxilo.<sup>2</sup> La “caja A” refuerza la unión del ADN al permitir una mayor estabilización estructural del DBD.<sup>1</sup> A pesar de estar presente, esta región no es funcional en GR y ER. Sin embargo, es posible que la “caja A” sea necesaria para estabilizar la estructura de estos dos receptores.

Junto con la región E, la región D constituye un componente del extremo carboxilo terminal, cuya función principal es actuar como bisagra, ya que se encuentra localizada entre el dominio de unión al ADN o DBD y el dominio de unión al ligando (LBD).

En la región D se encuentra un segmento de aminoácidos con características ácidas, que es reconocido por proteínas transportadoras (NIF) que le permiten interactuar con los componentes del complejo de poro, a través del cual el complejo hormona-receptor es transportado hacia el interior del núcleo, por lo que se le ha denominado a esa secuencia específica de aminoácidos como “secuencia de localización nuclear” (NLS).<sup>8</sup>

Los análisis, tanto de mutagénesis de sitio específico como el de la utilización de organismos *knock out*, han demostrado que en la región E se encuentra la secuencia de aminoácidos que le permiten unirse a la hormona o ligando en una forma estereo-específica al receptor.<sup>9</sup> Dicha secuencia es el dominio LBD, que ocupa la mayor parte del receptor y sus dos funciones están asociadas, la primera con la unión del ligando, y la segunda con la interacción de proteínas específicas de más de una variante de un tipo de receptores. Como producto de la interacción con un receptor específico y en ocasiones con sus variantes, este dominio permite la dimerización representada en la Figura 3.<sup>1</sup> De forma equivalente, la interacción del complejo hormona-receptor con el TFIID, uno de los factores generales de la transcripción, favorece un ensamble más eficiente del aparato de transcripción permitiendo la síntesis del ARNm.<sup>10</sup> Finalmente, en este dominio se unen también proteínas que inducen la variación estructural del complejo, especialmente

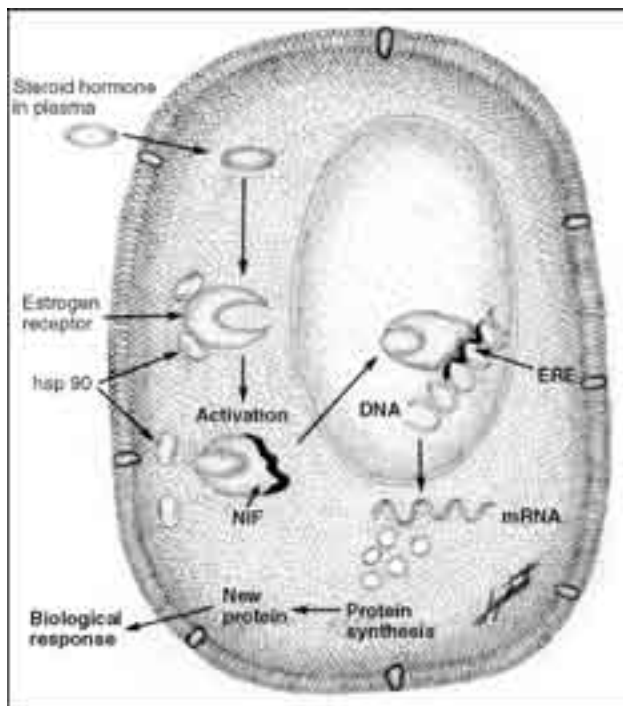
hormone, which, by means of its amphipatic features, crosses the cell membrane and binds to the receptor. This interaction induces a conformal change in the receptor. The site where the receptor binds to the 90 KDa molecular weight heat shock proteins (hsp90) is still unclear, since some authors<sup>17,18</sup> advocate the idea of a cytoplasmatic location, while others<sup>19</sup> support the concept of its location and interaction with the receptor in the nucleus.

Hormone-binding sites are variable in each receptor. Some show single binding sites, while others have many. Moreover, interactions among similar receptor molecules promote dimerization, either homologous or heterologous. Such is the case of estrogen receptors.<sup>8</sup>

A consequence of the conformal change is exposure of the nuclear location site (sequence) (NLS). When exposed, they interact with cytoplasmatic proteins such as NIF 1 y NIF 2, so the ligand-receptor unit is primarily placed near the channel or pore complex of the nuclear membrane, where it joins the proteins that make such a channel. Its new position causes an interaction with LM1 and LM2, nucleoplasmatic proteins that in turn act as vector carriers of the hormone-receptor complex to the inner nucleus.<sup>19</sup> pH, concentration and ionic activity of the nucleus make the receptor act as a specific transcription factor activator which by productive and unproductive interactions, locates the DNA structure. The DNA contains the sequence of its specific response element (HRE), to which the activated receptor binds. The recognition of the HRE by the hormone-receptor complex, allows interaction with the transcription factors (TF), mainly

las proteínas de choque térmico (hsp), que actúan como proteínas estabilizadoras del receptor que se encuentra en espera de unirse al ligando. Weihua *et al.*<sup>11</sup> consideran que la región terminal del receptor coadyuva a la estructuración total del propio receptor, permitiendo una estabilización del dominio de unión al ligando y la interacción proteínica, que le permite distinguir entre sustancias agonistas y antagonistas del ligando. Este fenómeno sólo ocurre en los ER, lo que es crucial desde el enfoque de la regulación de la transcripción celular y de aplicaciones terapéuticas, como se discutirá posteriormente.<sup>1,12,13</sup> La región F solamente difiere de la región E en que no está bien conservada cuando se compara entre los diferentes vertebrados, por lo que algunos textos la consideran a E y F como una sola región denominada E/F.<sup>14,15</sup>

La interacción de los ER con otras proteínas como la proteína p160 permite que se una a este complejo la histona-acetil-transferasa (HAT) que permite la modificación de la histona H1 de los nucleosomas, por lo que se ensambla un complejo activador en el sitio ERE. En este caso, la proteína p160 actúa como coactivador de la transcripción iniciada por el ER. Aunque no implicando la interacción con HAT, la unión de la proteína activadora de la transcripción (TRAP) al ER, permite la modificación del complejo nucleosomal del ERE, por lo que la maquinaria de transcripción, incluyendo a la ARN polimerasa II, tiene un acceso más eficiente. Este tipo de regulación de la interacción ER-ADN está equilibrado fisiológicamente por la presencia de correpresores. La unión de



**Figura 3.** Activación del receptor estrogénico: Al unirse el receptor con los estrógenos se desprende de las proteínas de choque térmico 90 (hsp90), por ello, cambia su conformación y expone la señal de localización del núcleo (NLS). El receptor entra al núcleo y se une a los elementos de respuesta al estrógeno (ERE) en el genoma, para iniciar la transcripción.

**Figure 3.** Activation of estrogen receptor: When the receptor binds to the estrogens it is detached from heat shock proteins 90 (hsp90), so their structure changes and the nuclear location signal (NLS) is exposed. The receptor goes to the inner nucleus and binds to the estrogen response elements (ERE) in the genome to start the transcription.



the TFIID, so that in a joint action with TIFA, the RNA polymerase II is stabilized and the carboxyl-terminal domain (CTD) is phosphorylated, so that ultimately the gene structural transcription may take place.<sup>20</sup>

The receptor role, in transcription activation, ends as it starts going back to the cytoplasm hiding the NLS, dissociating the dimeric complex and, finally, dissociating the hormone-receptor complex. Depending on relative hormone concentrations, the complex may reassociate, or it may be transported out of the cell according to its concentration gradient.

In order to be activated, receptors must phosphorylate in a process that requires physiologic doses of the ligand.<sup>21</sup> Tyrosine phosphorylation has been detected in human ER $\alpha$  in position 537, *in vivo* as well as *in vitro*.<sup>22</sup> When cells that have been transformed to express a particular type of receptor are used,<sup>23</sup> it has been found that after estradiol stimulation, most of the phosphoserine residues are located in the amino terminal in position 236 in the DBD, 294 in the hinge region, 305 in the LBD y 104, 106, 118, 154 and 167 of the A/B dominion.

The enzymes responsible for this process are tyrosine-kinase and casein-kinase II.<sup>24</sup> When estradiol is not present, other proteins that modulate ER $\beta$  phosphorylation include protein-kinase A, protein-kinase C,<sup>25</sup> extracellular signals such as peptidic growth factor, cytokine and neurotransmitters.

Although the main function of ER $\beta$  receptors is not the promotion or regulation of cell division, there are some cells in which the role of ER is important. Such is the case in breast hyperplasia, where ERs are part of the complex that interacts with cyclins so that they can regulate the cell cycle. At the same time, the interaction of ER with these proteins leads to an increase in the efficiency of stimulation shown as the specific synthesis of steroidogenic proteins. Thus, for example, when overexpression of cyclin A is induced in osteosarcoma cell cultures or HeLa cells, when estradiol is stimulated, ER phosphorylation increases; when there is no cyclin A overexpression and its association with Cdk2 (cyclin-dependent kinase), phosphorylation does not take place. When ER is phosphorylated, the transcription rate of reporter genes is increased. On the other hand, ER phosphorylation that depends on D1 cyclin expression does not require the involvement of the regulating portion of cyclin-dependent kinase.<sup>26</sup> In both cases, required estradiol concentrations are lower than needed if no cyclin overexpression is found.

### **Estrogen receptors**

So far, two receptor isoforms have been identified in estrogen receptors (ER): ER $\alpha$  and ER $\beta$ . Estrogens

la proteína Dax-1 permite que la transcripción de genes importantes para la diferenciación sexual masculina y la espermatogénesis sea atenuada en ratones tratados perinatalmente con citrato de tamoxifeno. En este caso, la unión de ER-Dax 1 forma un complejo que en lugar de permitir la interacción de la ARN polimerasa en los sitios ERE, ésta se vea interferida, por lo que no se ensambla adecuadamente evitando la expresión de genes.<sup>16</sup>

Aunque el proceso mediante el cual la función de los receptores está descrito con cierto detalle, aún existen aspectos que se hacen por analogía con otros modelos. En resumen, el primer paso en la activación es la unión de la hormona, que por sus características anfipáticas, atraviesa la membrana celular y se une al receptor. Esta interacción induce un cambio conformacional del mismo. El sitio donde el receptor se une a las proteínas de choque térmico de 90 KDa de peso molecular (hsp90) permanece poco claro, ya que algunos autores<sup>17,18</sup> favorecen la idea de su localización citoplasmática, mientras que otros<sup>19</sup> apoyan el concepto de su localización e interacción con el receptor a nivel nuclear.

Los sitios de unión de la hormona varían de receptor a receptor. Algunos de ellos muestran sitios únicos de unión, mientras otros tienen sitios múltiples. Aún más, las interacciones entre moléculas homólogas de receptores promueven la dimerización, tanto homóloga como heteróloga. Tal es el caso de los receptores a estrógenos.<sup>8</sup>

Una consecuencia del cambio conformacional es la exposición de sitios (secuencias) de localización nuclear (NLS). Éstas, al quedar expuestas, interactúan con proteínas citoplasmáticas del tipo de las NIF 1 y NIF 2, lo que permite que la unidad ligando-receptor sea posicionada primeramente en la vecindad del complejo del canal o poro de la membrana nuclear, en donde se asocia con las proteínas que conforman dicho canal. Su nueva posición lo coloca en forma tal que lo hace capaz de interrelacionarse con las láminas LM1 y LM2, proteínas nucleoplásmicas, que, a su vez, actúan como acarreadores vectoriales de los complejos hormona-receptor hacia el interior del núcleo.<sup>19</sup> Las condiciones nucleares de pH, concentración y actividad iónica permiten que el receptor actúe como activador de los factores de transcripción específica, que mediante interacciones productivas e improductivas localiza la estructura del ADN. El ADN contiene la secuencia de su elemento de respuesta específico (HRE), al cual se une el receptor activado. El reconocimiento del HRE por el complejo hormona-receptor, permite la interacción de éstos con los factores de transcripción (TF), principalmente el TFIID, para que en conjunto con el TIFA estabilizar a los ARN polimerasa II, fosforilar su dominio carboxilo terminal

found in plasma are introduced into their target cells in the so called "classic" tissue found in the uterus, breast, placenta, liver, central nervous system, cardiovascular system and bone. Target cells in this group of tissue are rich in ER $\alpha$ .

There are other tissues considered "non classic", such as prostate, ovaries, pineal gland, thyroid gland, parathyroid gland, adrenal glands and pancreas, as well as gall bladder, skin, urinary tract, lymphoid tissue, erythroid tissue, lung, intestinal epithelium, and some regions in the brain that express few ER $\alpha$ , but significant amounts of ER $\beta$ . Striated muscle tissue is unique, since ER $\beta$  is highly expressed in it and ER $\alpha$  is almost absent.<sup>11,12</sup>

As members of the nuclear receptors superfamily, estrogen receptors modulate transcription interacting with the cell DNA regulatory sequences, binding selectively with specific genome sequences, as well as corepressors and coactivators to regulate the action of the RNA polymerase complex. Transcription is modulated by ER in a sequential series of events. When the ERs bind with estrogens, changes are elicited in the receptor shape with the dissociation of an ER corepressor complex which binds with a coactivator complex. The latter are molecules that interact with the receptor conferring the transcription function and resulting in transcription of genes that have response elements for estrogens (ERE). On the contrary, when estrogens are absent, ERs are associated with corepressors that inhibit the transcription activity.<sup>17,27,28</sup> As we shall see later, the interaction of ligands, repressors, corepressors, activating proteins and analogues are highly regulated mechanisms.

## **ER structure**

In case of estrogen receptors, the ER $\alpha$  y ER $\beta$  types have been identified. These receptors are different in terms of transcription inducing efficiency.<sup>27,29</sup> It was initially found that ER $\alpha$  played the main role. However, the recombinant DNA methods led to the clonation, characterization and study of ER $\beta$  as well as additional variants of these genes. It is currently known that from the two general variants, there are molecules that show changes in sequence and structure without additional genes. The explanation for these new variations depends on the way that the mRNA is processed from the time of transcription to the time of transportation to the cytoplasm, where it will be turned into a protein.

Just like a great many eukaryote genes, the DNA contains sequences that are transcribed and also transformed, while others, although collinear with the former ones, are transcribed but not transformed; therefore, not represented in the protein. Wally Gil-

(*carboxy-terminal domain*, CTD); para que finalmente se lleve a cabo la transcripción del gene estructural.<sup>20</sup>

La intervención del receptor en la activación de la transcripción culmina cuando se inicia su camino de regreso al citoplasma con el ocultamiento de la NLS, la disociación del complejo dimérico, y, finalmente, la disociación del complejo hormona-receptor. Dependiendo de las concentraciones relativas de la hormona, se puede reasociar el complejo, o bien ser transportada de acuerdo con su gradiente de concentración hacia el exterior de la célula.

Para la activación de los receptores es necesario que éstos se fosforilen, en un proceso que requiere de dosis fisiológicas del ligando.<sup>21</sup> Se ha detectado la fosforilación de la tirosina en el ER $\alpha$  de origen humano en la posición 537 tanto *in vivo* como *in vitro*.<sup>22</sup> Cuando se utilizan células que han sido transformadas para expresar un tipo particular de receptor,<sup>23</sup> se ha encontrado que tras la estimulación con estradiol, la mayoría de los residuos de fosfoserina se localizan en la región amino-terminal en la posición 236 en el DBD, 294 en la región de la bisagra, 305 en el LBD y 104, 106, 118, 154 y 167 del dominio A/B.

Las enzimas responsables de este proceso son tirosin-cinasa, casein-cinasa II.<sup>24</sup> En ausencia de estradiol, otras proteínas que modulan la fosforilación del ER $\beta$  incluyen a la proteincinasa A, proteincinasa C,<sup>25</sup> señales extracelulares como los factores de crecimiento peptídico, citosina y neurotransmisores.

Si bien la función principal de los receptores ER $\beta$  no es la promoción o regulación de la división celular, hay algunas células en las cuales es importante la participación de los ER en este aspecto. Tal es el caso de la hiperplasia de glándula mamaria, en las cuales el ER forma parte del complejo que interactúa con las ciclinas para que éstas puedan llevar a cabo la regulación del ciclo celular. Al mismo tiempo, la interacción de ER con estas proteínas permite un aumento en la eficiencia de la estimulación evidenciada como la síntesis específica de proteínas esteroideogénicas. Así, por ejemplo, cuando se induce la sobreexpresión de la ciclina A en cultivos celulares de osteosarcomas o de células HeLa, al estimular con estradiol, se incrementa la fosforilación del ER, mientras que cuando no se induce la sobreexpresión de ciclina A y su asociación con la Cdk2 (cinasa dependiente de ciclina), esta fosforilación no ocurre. Al fosforilarse el ER, se incrementa la tasa de transcripción de genes reporteros. Por otro lado, la fosforilación del ER dependiente de la expresión de ciclina D1, no requiere de la intervención de la porción reguladora de la cinasa dependiente de ciclina.<sup>26</sup> En ambos casos, las concentraciones de estradiol que se requieren son inferiores a las que se necesitarían si no se hace la sobreexpresión de las ciclinas.

bert called exons the first type of sequences, to make the difference with the transcribes that make the introns and stay in the nucleus.

Even so, not in all cases the splicing involves the total removal of introns and overlapping of all exons to make the RNA that will ultimately be transformed.

When not all the introns are excluded or only exons are selectively overlapped, the resulting protein is called protein variant derived from an alternative overlapping. The term in English is *splice variant*, indicating that it is not an alternative gene, but a process where one of the protein modules is changed by another without a mutation or recombination or any other process that changes the gene. The molecular mechanisms of the general and alternative splicing process are well documented. There are even some authors that consider it to be a mechanism that expands the variability in the body.<sup>30</sup>

In the specific case of ER $\beta$ , the carboxy terminal, DNA and amino terminal binding dominions are the ones showing variants in splicing. In human testes, the ER $\beta$ cx variant has a variation starting in exon 8 where an alternative exon arrives coding for 23 amino acid residues instead of the 65 that should be found if the classic exon 8 were to overlap. Obviously, the functional consequence of this change is the efficiency with which the transcription is induced, since it is found within the region that activates the transcription (TAF2). Comparatively, in the variant that includes exon 8 the receptor can bind with the ligand, but not with the ERE in the DNA. Although this function may seem inadequate, it is also important, since it regulates the portion of the ligand bound to receptors that have the proper structure for transcription, so only the proper population of receptors are the ones in charge of transcription at a certain level in specific genes, even if the tissue is found in an environment where there are more ligands than needed for optimal function.<sup>31</sup> Similarly, the ER $\beta$ cx variant can make more dimers with the ER $\alpha$  than with ER $\beta$ , so it interferes in the ER $\beta$  dependent transcription process.<sup>31</sup>

If the sequence of amino acids is compared between ER $\alpha$  and ER $\beta$ , both receptors have 96% similarity in structural amino acids, although it is not a rule applicable to all regions of the receptor, since in the DBD and LBD regions there is only a 53% similarity (Figure 4). Although there is no experimental proof, these data suggest that the ER $\beta$  may recognize and bind to similar ERE that the ER $\alpha$  recognizes and binds. However, each of them has a different affinity for the different ligands. On the other hand, the small similarity between both receptors in the TAF1 and TAF2 portions suggests that different types of proteins interact in the transcription complex and on specific tissue.<sup>11,32</sup> Experimental evidence shows

## **Receptores estrogénicos**

Hasta la fecha han sido identificados dos isoformas de receptores estrogénicos (ER): los ER $\alpha$  y los ER $\beta$ . Los estrógenos presentes en el plasma penetran a sus células blanco en tejidos llamados "clásicos" que se encuentran en el útero, glándula mamaria, placenta, hígado, sistema nervioso central, sistema cardiovascular y hueso. Las células blanco de este grupo de tejidos son ricas en ER $\alpha$ .

Existen otros tejidos considerados "no clásicos", entre los que se incluyen próstata, ovarios, glándula pineal, glándula tiroides, paratiroides, adrenales y páncreas, así como vesícula biliar, piel, tracto urinario, tejido linfóide, tejido eritroide, pulmón, epitelio intestinal y algunas regiones del cerebro que expresan poco ER $\alpha$ , pero que contienen cantidades significativas de ER $\beta$ . El tejido muscular estriado es único, puesto que en él se expresa de manera elevada el ER $\beta$  y está casi ausente el ER $\alpha$ .<sup>11,12</sup>

Como miembros de la superfamilia de los receptores nucleares, los estrogénicos modulan la transcripción al interactuar con las secuencias regulatorias del ADN celular, al unirse en forma discriminada con secuencias específicas del genoma, así como a correpresores y coactivadores para regular la acción del complejo de ARN polimerasa. Los efectos moduladores de los ER sobre la transcripción se llevan a cabo en una serie secuencial de eventos. Al unirse los ER con los estrógenos, desencadenan cambios en la forma del receptor que consisten en la disociación de un complejo correpresor del ER y la unión de éste con un complejo coactivador. Estos últimos son moléculas que al interactuar con el receptor le confieren la actividad de transcripción, resultando en la transcripción de genes que contienen elementos de respuesta a los estrógenos (ERE). Por el contrario, en ausencia de estrógenos, los ER se asocian con los correpresores que inhiben la actividad de transcripción.<sup>17,27,28</sup> Como se verá posteriormente, la interacción de ligandos, represores, correpresores, proteínas activadoras y análogos son mecanismos altamente regulados.

## **Estructura de los ER**

En el caso de los receptores estrogénicos, hasta la fecha se han identificado las variedades ER $\alpha$  y ER $\beta$ . Estos receptores son diferentes en cuanto a la eficiencia con que inducen la transcripción.<sup>27,29</sup> Inicialmente se había encontrado que la principal función la llevan a cabo los receptores ER $\alpha$ . Sin embargo, el empleo de las metodologías de ADN recombinante permitió la clonación, caracterización y estudio tanto de los ER $\beta$  como de variantes adicionales de estos genes. Actual-

how the two receptors bind to classic ERE, with similar affinity, such as 17  $\beta$ -estradiol, with 0.06 nM for ER $\alpha$  and with 0.02nM for ER $\beta$ . However, the results obtained using different ligands, such as coumestrol and genistein show ER $\beta$  preference.<sup>33, 34</sup>

ER $\alpha$  is important for cell proliferation and weight increase in the uterus. The ER $\beta$  has similar actions in the uterus, but requires higher ligand concentrations than the ER $\alpha$ .<sup>34</sup> When the ER $\alpha$  is occupied by estrogens, the amount of mRNA that codes for progesterone receptors (PR) and androgen receptors (AR) decreases. In contrast, when the  $\beta$  is bound to its ligand with low affinity, only a marginal decrease in PR and AR is induced. When both,  $\alpha$  y  $\beta$  ER are occupied, they apparently work jointly increasing mRNA suppression in PRs. The synergy in both ER types found on PRs has only been seen in epithelial cells of the uterine lumen. Some authors suggest that the ER $\alpha$  modulates the PRs in the uterus by itself, while the AR expression is also regulated by ER $\alpha$ , but can be modulated by ER $\beta$ .<sup>35, 36</sup>

Estrogens as well as ER $\alpha$  and ER $\beta$  are important for ovarian tissue. Estrogens are produced by granulosa cells in the ovarian follicle during child-bearing age; ER $\alpha$  is the one with the highest expression in interstitial stroma cells and in theca cells. The ER $\beta$  is mainly synthesized in the granulosa of the growing follicles, although it can also be produced in some cells of the ovarian stroma in certain species.<sup>11</sup>

In mice experimental models where the  $\beta$  estrogen receptor is not expressed (ER $\beta$  -/-), ovarian follicles show progressive atresia and decreased ovulation.<sup>11</sup>

Estrogens are also important in male reproduction, since in the vas and rete testis of the testicle great amounts of ER $\beta$  are expressed, while ER $\alpha$  and  $\beta$  are expressed in the epididymus. The rete testis transports sperm to the epididymus for maturation. Most fluid found in sperm cells coming from the rete testis is absorbed here. This action is estrogen-mediated; estrogens promote greater sperm concentration increasing survival and maturation of sperm cells. Estrogen deficiency or tissue insensitivity to estrogens results in fluid accumulation in the vas, an increase in testicular weight and, ultimately, atrophy of the gonads.<sup>37</sup>

Besides its action in the reproductive organs, the ER $\alpha$  is important in bone remodeling. It has been proven that when ER $\alpha$  is absent or found in only small amounts, bone remodeling decreases. If only ER $\beta$  is present, even in high estrogen concentrations, it is not enough for this purpose.<sup>38, 39</sup>

In the CNS, ER $\alpha$  is present in nerve cells of the medial preoptic region, the hypothalamic arcuate and ventromedial nuclei and the amygdala. All of these areas are involved in the regulation of gonadal function and are responsible of sexual behavior.<sup>40</sup> The ER $\beta$  is expressed in the brain cortex, the hippocampus, and

mente se sabe que de las dos variantes generales, hay moléculas que presentan cambios en su secuencia y estructura sin que se trate de genes adicionales. La explicación de estas nuevas variaciones depende de la forma en que se procesa el ARNm desde que se transcribe hasta que es transportado al citoplasma, donde será transformado en proteína.

Al igual que gran cantidad de genes eucariontes, el ADN contiene secuencias que son transcritas y además transformadas, mientras que otras aún siendo colineares con las anteriores son transcritas pero no transformadas, por lo que no están representadas en la proteína. Al primer tipo de secuencias, Gilbert les denominó exones, para diferenciarlas de los transcritos que conforman a los intrones y que permanecen en el núcleo.

Aun así, no en todos los casos la remoción de intrones y el empalme de exones, proceso que en inglés se denomina *splicing*, implica la remoción total de los intrones y el empalme de todos los exones para formar el ARN que será finalmente transformado.

Cuando no están excluidos todos los intrones o sólo algunos exones son selectivamente empalmados, a la proteína resultante se le denomina variante proteínica derivada de un empalme alternativo, cuyo término en inglés es *splice variant*, con lo que se indica que no se trata de un gen alternativo, sino de un proceso en donde uno de los módulos de la proteína es cambiado por otro sin que tenga lugar mutación, recombinación o algún otro proceso que altere al gen. Los mecanismos moleculares tanto del proceso de corte y empalme general, como el alterno, están bien documentados e incluso hay algunos autores que lo toman como un mecanismo que amplía la variabilidad con que cuenta el organismo.<sup>30</sup>

En el caso particular de los ER $\beta$ , los dominios carboxilo terminal, el de unión al ADN y amino-terminal, son los que presentan variantes en el corte y empalme. En el testículo humano la variante ER $\beta$ cx presenta variación a partir del exon 8 en el cual se presenta un exon alterno que codifica para 23 residuos de aminoácidos en lugar de los 65 que deberían estar presentes si se empalmara el exon 8 clásico. Obviamente la consecuencia funcional de este cambio es la eficiencia con que se induce la transcripción al estar comprendida en la región que activa la transcripción (TAF2). Comparativamente, la variante que incluye al exon 8 el receptor puede unirse con el ligando, pero no así con el ERE en el ADN. Aunque este funcionamiento pudiera parecer inadecuado, también es importante, pues regula la población de ligando unido a receptores que tengan una conformación adecuada para llevar a cabo la transcripción, por lo que solamente una población adecuada de receptores bien conformados son los encargados de que se transcriban a un deter-



the paraventricular and supraoptic nuclei of the hypothalamus, where the ER $\alpha$  is absent or at least has not been identified.<sup>11</sup>

The distribution pattern of both receptors suggests that they have different functions in the brain. In experimental models with *knockout* mice (ER $\alpha$ <sup>-/-</sup>), (meaning that they do not express ER $\alpha$ ), no CNS disturbances have been found. However, important changes have been detected in brain morphology of ER $\beta$  -/- mice, like a decreased number of nerve cells in the brain, as well as a somatosensory deficit in the brain cortex, although with high cell proliferation in the astroglia of the limbic system, but not in the cortex.<sup>41</sup>

In the cardiovascular system ER $\alpha$  and ER $\beta$  are expressed.<sup>42</sup> Estrogens inhibit vascular response to injury and atherosclerosis. The protective effect from estrogens is probable due to the inhibition of cell proliferation in the vascular smooth muscle and the stimulation of endothelial cell size, leading to vasodilation.<sup>43</sup>

### Non genomic estrogen effects

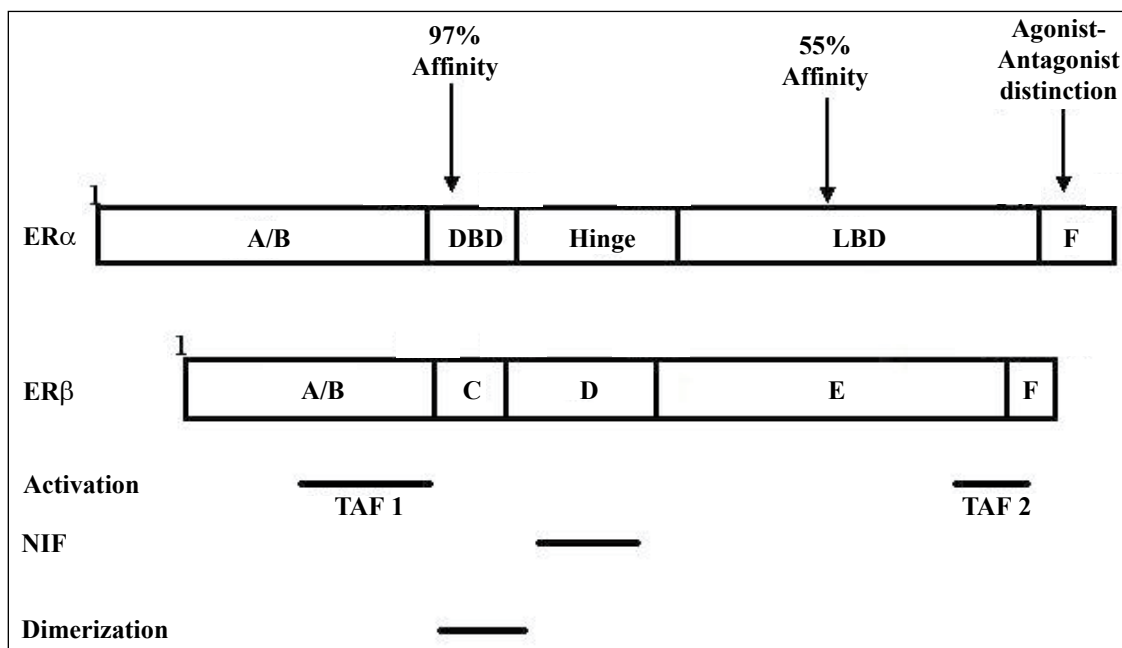
In contrast with the genomic estrogen effects that were already mentioned and which are mediated by ER $\alpha$  or  $\beta$ , additional estrogen effects have been discovered which cannot be explained by the traditional interactions of the ligand with the ER. Unlike the response that involves mRNA synthesis first and then trans-

minado nivel los genes específicos, aunque el tejido se encuentre en un ambiente en donde la presencia de ligandos sea mucho mayor a la requerida para el óptimo funcionamiento.<sup>31</sup> De la misma forma, la variante ER $\beta$ cx puede formar dímeros con el ER $\beta$  más que con el ER $\alpha$ , por lo que interfiere en el proceso de transcripción dependiente de ER $\alpha$ .<sup>31</sup>

Si se compara la secuencia de aminoácidos entre los ER $\alpha$  y ER $\beta$ , ambos receptores presentan 96% de homología de sus aminoácidos constituyentes, aunque no es una regla aplicable a todas las regiones del receptor; ya que en las regiones DBD y LBD sólo existe una similitud de 53% (Figura 4). Aunque no se han demostrado experimentalmente, estos datos sugieren que el ER $\beta$  puede reconocer y unirse a ERE similares a los que el ER $\alpha$  reconoce y une. Sin embargo, cada uno de ellos tienen una afinidad diferente por los distintos ligandos. Por otro lado, la poca similitud entre ambos receptores en las porciones TAF1 y TAF2 sugiere que diferentes tipos de proteínas interactúan en los complejos de transcripción y éstas sobre tejidos específicos.<sup>11,32</sup>

Existen evidencias experimentales que muestran cómo los dos receptores se unen a ERE clásicos, con similar afinidad, como el 17 $\beta$ -estradiol, con 0.06 nM para el ER $\beta$  y con 0.02 nM para el ER $\alpha$ . Sin embargo, los resultados obtenidos utilizando diferentes ligandos, como el coumestrol y la genisteína, muestran preferencia por el ER $\beta$ .<sup>33,34</sup>

El ER $\alpha$  es importante en la proliferación de células



**Figura 4.** Comparación estructural entre receptores estrogénicos  $\alpha$  y  $\beta$ .

**Figure 4.** Structural comparison between  $\alpha$  and  $\beta$ .estrogen receptors.



formation into a specific protein, recently estrogen actions that take place in seconds have been investigated. In these cases gene expression stimulation does not happen and these types of responses have been called "non genomic effects" of estrogens, seen in several cell types.<sup>44</sup> The use of DNA transcription inhibitors like actinomycin or cycloheximide are not efficient enough to inhibit estrogen actions of the non genomic type. On the contrary, it has been proven that they are involved in processes like the recruitment of cell membrane location signals including a second cyclic messenger AMP, calcium and nitric oxide, as well as the activation of kinases such as tyrosin kinase, protein kinase A (PKA), protein kinase C (PKC), ERK (*extracellular signal-regulated kinase*) and protein kinase B (PKB), among others. These processes that are similar to those evoked by transmembrane receptors bound to their ligands have been seen in neuronal, vascular and bone systems.<sup>44-46</sup>

### **Selective modulators of estrogen receptors**

Studies on ER physiology have taken advantage of the action or selective modulating substances of estrogen receptors (SERM), drugs that act as a ligand in the LBD of the estrogen receptor. As a SERM binds to an LBD of the ER, changes in the receptor structure are induced, with different sorts of activations, such as an agonist or antagonist action, depending on the type of cell and the presence of promoters and associated coregulators.<sup>14,47</sup> Currently, SERMs have mainly been used as part of estrogen-dependent tumor treatments for the breast or prostate.<sup>48</sup> A promising discovery refers to the use of raloxiphen as a potential inhibitor of breast tumors. Its main application is for osteoporosis prevention, with a decrease in fracture risk because of an increase in bone mineral density. Other beneficial effects of raloxiphen have been found in the cardiovascular system and the uterus, acting as an estrogen antagonist.<sup>49</sup>

This brief review tries to give an updated vision of the available studies on estrogen receptors. Some of the processes needed for target tissue responses through estrogen stimulation are still not clear, even in specialized literature. Not meaning to get into the creation, structure and fine regulation of the expression of genes involved in this process, a correlation among receptor structure, function and regulation has been described to make it easy for readers to understand.

### **Acknowledgements**

The authors wish to thank Juan Jesús Tadeo-Trejo for his support in creating and designing the illustration for this document.

y el aumento de peso del útero. El ER $\beta$  ejerce acciones similares a nivel uterino, pero requiere concentraciones mayores del ligando que el ER $\alpha$ .<sup>34</sup> Cuando el ER se encuentra ocupado por estrógenos, disminuye la cantidad de ARNm que codifica para los receptores de progesterona (PR) y de andrógenos (AR). En contraste, cuando el ER $\beta$  se encuentra unido a su ligando con baja afinidad, solamente induce una disminución marginal en PR y AR. Cuando ambos ER,  $\alpha$  y  $\beta$  se encuentran ocupados, aparentemente trabajan en cooperación incrementando la supresión de ARNm del PR. La acción sinérgica de ambos tipos de ER sobre los PR sólo se ha observado en las células epiteliales del lumen uterino. Algunos autores sugieren que el ER $\alpha$  regula a los PR en el útero por sí solo, mientras que la expresión del AR es regulada por el ER $\alpha$ , pero puede ser modulada por el ER $\beta$ .<sup>35,36</sup>

Tanto los estrógenos como los ER $\alpha$  y ER $\beta$  son de importancia en los tejidos del ovario; los estrógenos son producidos por las células de la granulosa en el folículo ovárico durante la vida reproductiva, siendo el ER $\alpha$  el que más se expresa en las células intersticiales del estroma y en las células de la teca. El ER $\beta$  se sintetiza principalmente en la granulosa de los folículos en crecimiento, aunque también se puede expresar en algunas células del estroma ovárico de algunas especies.<sup>11</sup>

En modelos experimentales, como los ratones, en los que no se expresa el receptor estrogénico  $\beta$  (ER $\beta$  -/-), los folículos ováricos muestran atresia progresiva y reducción en la ovulación.<sup>11</sup>

Los estrógenos también son de importancia en la reproducción del macho, ya que en los vasos deferentes y rete *testis* del testículo se expresa gran cantidad de ER $\alpha$ , mientras que en el epidídimo se expresan tanto los ER $\beta$  como los  $\beta$ . La rete *testis* transporta los espermatozoides al epidídimo para su maduración. Aquí se lleva a cabo la absorción de una buena parte del líquido que acompaña a las células espermáticas provenientes de la rete *testis*. Esta acción es mediada por estrógenos, que al incrementar la concentración espermática favorecen su sobrevivencia y maduración. La deficiencia de estrógenos o la insensibilidad tisular a ellos resulta en la acumulación de fluidos en los vasos deferentes, un incremento del peso testicular y una atrofia posterior de dichas gónadas.<sup>37</sup>

Además de las funciones que se observa en los órganos reproductivos, los ER $\alpha$  son importantes en la remodelación ósea. Se ha demostrado que la ausencia del ER $\alpha$  o baja cantidad de estrógenos, disminuyen la remodelación ósea. La sola presencia de los escasos ER $\beta$ , aun ante elevadas concentraciones de estrógenos, no es suficiente para este fin.<sup>38,39</sup>

En el SNC, el ER $\alpha$  está presente en las neuronas

## Referencias

1. Egea PF, Klaholz BP, Moras D. Ligand protein interactions in nuclear receptor hormones. *FEBS Lett* 2000; 476: 62-67
2. Heinlein CA, Chang C. Androgen receptor (AR) coregulators: An Overview. *Endocr Rev* 2002; 23: 175-200.
3. DeFranco DB. Navigating steroid hormone receptors through the nuclear compartment. *Mol Endocrinol* 2002; 16:1449-1455
4. Nadal A, Roperio AB, Fuentes E, Soria B. The plasma membrane estrogen receptor: nuclear or unclear? *Trends Pharmacol Sci* 2001; 22: 597-599
5. Cowley SM, Parker MG. A comparison of transcriptional activation by ER and ER. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1999;69:165-175
6. Bunone G, Briand PA, Miksicek RJ, Picard D. Activation of the unliganded estrogen receptor by EGF involves the MAP kinase pathway and direct phosphorylation. *EMBO J* 1996;15:2174-2183.
7. Freedman LP. Anatomy of the steroid receptor zink finger region. *Endocr Rev* 1992; 13: 129-145.
8. Black BE, Holaska JM, Rastinejad F, Paschal BM. DNA binding domains in diverse nuclear receptor function as nuclear export signal. *Curr Biol* 2001; 11: 1749-1758
9. Bapat AR, Frail DE. Full-length estrogen receptor and its ligand-binding domain adopt different conformations upon binding ligand. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2003; 86:143-149.
10. Onate SA, Boonyaratanakornkit V, Spencer TE, Tsai SY, Tsai M, Edwards DP *et al.* The steroid receptor coactivator-1 contains multiple receptor interacting and activation domains that cooperatively enhance the activation function 1 (AF1) and AF2 domains of steroid receptors. *J Biol Chem* 1998;279 :12101-12108.
11. Weihua Z, Andersson S, Cheng G, Simpson ER, Warner M, Gustafsson J. Update on estrogen signaling. *FEBS Lett* 2003 ; 546:17-24.
12. Mosselman J, Polman R. Dijkema, ER: identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Lett* 1996;392: 49-53.
13. Westin S, Kurokawa R, Nolte RT, Wisely GB, McInerney EM, Rose DW, *et al.* Interactions controlling the assembly of nuclear receptor heterodimers and co-activators. *Nature* 1998;395:199-202.
14. Brozozowski AM, Pike AC, Dauter Z, Hubbard RD, Bonn T, Engström O *et al.* Molecular basis of agonism and antagonism in the estrogen receptor. *Nature* 1997;389:753-758.
15. Hu X, Lazar MA. The CoRNR motif controls the recruitment of corepressors by nuclear hormone receptors. *Nature* 1999;402:93-96
16. Nillson S, Mäkelä S, Treuter E, Tujague M, Thomsen J, Anderson G *et al.* Mechanisms of estrogen action. *Physiol Rev* 2001;81:1535-1565.
17. Montano MM, Müller V, Trobaugh A, Katzenellenbogen BS. The carboxyterminal F domain of the human estrogen receptor: role in the transcriptional activity of the receptor and the effectiveness of antiestrogens as estrogen antagonists. *Mol Endocrinol* 1995;9:814-825.

localizadas en el área preóptica medial, en los núcleos hipotalámicos arqueado, ventromedial y en la amígdala. Todas estas áreas están involucradas en la regulación de la función gonadal y son responsables de la conducta sexual.<sup>40</sup> El ERβ se expresa en la corteza cerebral, el hipocampo, así como en los núcleos paraventricular y supraóptico del hipotálamo, donde el ERα no se encuentra o al menos no ha sido identificado.<sup>11</sup>

El patrón de distribución de ambos receptores sugiere que tienen diferentes funciones en el cerebro. En modelos experimentales con ratones *knocked out* no expresan el ERα (ratones ERα<sup>-/-</sup>); no se han encontrado alteraciones en el SNC. Sin embargo, se han detectado cambios importantes en la morfología del cerebro en ratones ERβ<sup>-/-</sup>, como la hipocelularidad en el cerebro, así como un déficit de tipo somatosensorial a nivel de la corteza cerebral; en cambio, es marcada la proliferación de células de la astrogliia en el sistema límbico, mas no en la corteza.<sup>41</sup>

En el sistema cardiovascular se expresan tanto los ERα como los ERβ.<sup>42</sup> Aquí los estrógenos inhiben la respuesta vascular al daño y el desarrollo de aterosclerosis. El efecto protector de los estrógenos probablemente se deba a la inhibición de la proliferación celular en el músculo liso vascular y a la estimulación del tamaño de las células endoteliales, produciendo vasodilatación.<sup>43</sup>

### **Efectos no genómicos de los estrógenos**

En contraste con los efectos genómicos de los estrógenos, a los que ya se hizo referencia y que están mediados por un ERα o β, se han descubierto efectos adicionales de los estrógenos que no son explicados por las interacciones tradicionales del ligando con el ER. A diferencia de la respuesta que implica la síntesis, primero de un ARNm para luego ser transformado en una proteína específica, recientemente se han examinado acciones de los estrógenos que se ejecutan en segundos. En estos casos se ha determinado que no tiene lugar la estimulación de la expresión génica, por lo que a este tipo de respuestas se les ha denominado "efectos no genómicos" de los estrógenos, observados en diferentes tipos celulares.<sup>44</sup> El uso de inhibidores de la transcripción del ADN como la actinomicina o la cicloheximida, no son eficientes para inhibir las acciones estrogénicas de tipo no genómico. Por el contrario, se ha demostrado que intervienen procesos como el reclutamiento de señales de localización de la membrana celular, que incluyen al segundo mensajero AMP cíclico, calcio y óxido nítrico, así como la activación de cinasas como tirosincinasa, proteincinasa A (PKA), proteincinasa C (PKC), ERK (*extracellular signal-regulated kinase*) y la proteincinasa B (PKB),

18. Knoblauch R, Garabedian MJ. Role for Hsp90-Associated cochaperone p23 in estrogen receptor signal transduction. *Mol Cell Biol* 1999;19:3748-3759.
19. Klinge CM. Estrogen receptor interaction with co-activators and co-repressors. *Steroids* 2000; 65:227-251.
20. Forbes DJ. Structure and function of the nuclear pore complex. *Annu Rev Cell Biol* 1992; 8:495-527.
21. Aronica SM, Katzenellenbogen BS. Stimulation of estrogen receptor-mediated transcription and alteration in the phosphorylation state of the rat uterine estrogen receptor by estrogen, cyclic adenosine monophosphate, and insulin-like growth factor-I. *Mol Endocrinol* 1993;7:743-752.
22. Arnold SF, Obourn JD, Jaffe H, Notides AC. Phosphorylation of the human estrogen receptor on tyrosine 537 *in vivo* and by src family tyrosine kinases *in vivo*. *Mol Endocrinol* 1995;9:24-33.
23. LeGoff P, Montano MM, Schodin DJ, Katzenellenbogen BS. 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.
24. Arnold SF, Obourn JD, Jaffe H, Notides AC. Phosphorylation of the human estrogen receptor by mitogen-activated protein kinase and casein kinase II: consequence DNA binding. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1995;55:163-172.
25. Ignar-Trowbridge DM, Pimentel M, Parker MG, McLachlan JA, Korach KS. Peptide growth factor cross-talk with the estrogen receptor requires the A/B domain and occurs independently of protein kinase C or estradiol. *Endocrinology* 1996;137:1735-1744.
26. Trowbridge JM, Rogatsky I, Garabedian MJ. Regulation of estrogen receptor transcriptional enhancement by the cyclin A/Cdk2 complex. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997;94:10132-10137.
27. Maniatis T, Reed R. An extensive network of coupling among gene expression machines. *Nature* 2002; 416:499-506.
28. Hewitt SC, Korach KS. Oestrogen receptor knockout mice: roles for estrogen receptors and in reproductive tissues. *Reproduction* 2003 ; 125 : 143-149.
29. Levin ER. Genome and hormones: Gender differences in physiology. Invited Review: Cell localization, physiology and nongenomic actions of estrogen receptors. *J Appl Physiol* 2001;91:1860-1867.
30. Maniatis T, Tasic B. Alternative pre-mRNA splicing and proteome expansion in metazoas. *Nature* 2002;418:236-243.
31. Ogawa S, Inoue S, Watanabe T, Orimo A, Hosoi T, Ouchi Y *et al*. Molecular cloning and characterization of human estrogen receptor $\beta$ : a potential inhibitor of estrogen action in human. *Nucleic Acid Res* 1998;26:3505-3512.
32. Cowley SM, Hoare S, Mosselman S, Parker MG. Estrogen receptor and form heterodimers an DNA. *J Biol Chem* 1997;272:19858-19862.

entre otras. Estos procesos que semejan a los evocados por receptores transmembranales unidos a sus ligandos, se han observado en los sistemas neuronal, vascular y óseo.<sup>44-46</sup>

### **Moduladores selectivos de los receptores estrogénicos**

Los estudios de la fisiología de los ER han tomado ventaja de la acción de sustancias moduladoras selectivas de los receptores estrogénicos (SERM), fármacos que actúan como ligando en el LBD del receptor estrogénico. Al unirse un SERM y un LBD de los ER, promueven los cambios de conformaciones del receptor, activándolo así de diferentes maneras, como agonista o antagonista. Lo anterior depende del tipo de célula y la presencia de los promotores y correguladores asociados.<sup>14,47</sup> Actualmente, los principales usos que se le ha dado a los SERM es como un componente en la terapia de tumores dependientes de estrógenos que se desarrollan en la glándula mamaria y la próstata.<sup>48</sup> Un promisorio descubrimiento se refiere al uso del raloxifeno como un inhibidor potencial de la proliferación de tumores mamarios, siendo su aplicación principal la prevención de osteoporosis, con la consecuente disminución del riesgo de fracturas por el incremento de la densidad mineral ósea. También se han demostrado efectos benéficos del raloxifeno en el sistema cardiovascular y en el útero, donde actúa como antagonista estrogénico.<sup>49</sup>

En esta escueta revisión se proporciona un panorama actualizado de los estudios disponibles de los receptores estrogénicos. Aun en la literatura especializada no quedan claros algunos de los procesos que deben realizarse para que la estimulación estrogénica induzca la respuesta del tejido blanco. Sin tratar de llegar a los extremos de la constitución, estructuración y regulación fina de la expresión de los genes implicados en el proceso, se ha establecido una correlación entre la estructura, función y regulación de los receptores para brindar de manera accesible estos aspectos a los lectores.

### **Agradecimientos**

Se agradece a Juan Jesús Tadeo Trejo su apoyo artístico en el diseño y elaboración de la imagen que ilustra este documento.

---

33. 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: 5925-5930.

34. Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, van der Saag PT *et al*. Interaction of estrogenic

- chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology* 1998;139: 4252-4263.
35. Fazor J, Barnett DH, Danes JM, Hess R, Parlow AF, Katzenellenbogen BS. Response-specific and ligand dose-dependent modulation of estrogen receptor (ER) activity by ER in the uterus. *Endocrinology* 2003; 144 : 3159-3166.
  36. Weihua Z, Saji S, Makinen S, Cheng G, Jensen EV, Warner M *et al.* Estrogen receptor (ER) beta, a modulator of ER alpha in the uterus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97: 5936-5941
  37. Hess RA, Bunick D, Lee K, Bahr J, Taylor JA, Korach KS *et al.* A role for oestrogens in the male reproductive system. *Nature* 1997;390: 509-511
  38. Lee K, Jessop H, Suswillo R, Zaman G, Lanyon L. Bone adaptation requires oestrogen receptor. *Nature* 2003; 424: 389.
  39. Vasudevan N, Ogawa S, Pfaff D. Estrogen and thyroid hormone receptor interactions: Physiological flexibility by molecular specificity. *Physiol Rev* 2002;82:923-944.
  40. Rodriguez-Medina MA, Reyes A, Chavarria ME, Vergara-Onofre M, Canchola E, Rosado A. Asymmetric calmodulin distribution in the hypothalamus: role of sexual differentiation in the rat. *Pharmacol Biochem Behav* 2000; 72:189-195.
  41. Wang L, Andersson S, Warner M, Gustafsson JA. Morphological abnormalities in the brains of estrogen receptor beta knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98:2792-2796.
  42. Pare G, Krust A, Karas RH, Dupont S, Arnovitz M, Chambon P *et al.* Estrogen receptor- mediates the protective effect of estrogen against vascular injury. *Circ Res.* 2002;90:1087-1092.
  43. Luconi M, Forti G, Baldi E. Genomic and nongenomic effects of estrogens:molecular mechanisms of action and clinical implications for male reproduction. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2002;80: 369-381.
  44. Moggs JG, Orphanides G. Estrogen receptors: orchestrators of pleiotropic cellular responses. *EMBO rep* 2001;2:775-781.
  45. Ho KJ, Liao JK. Non-nuclear actions of estrogen: New targets for prevention and treatment of cardiovascular disease. *Mol Interv* 2002; 2:219-228.
  46. Wong C, McNally C, Nickbarg E, KommBS, Cheskis B. Estrogen receptor-interacting protein that modulates its nongenomic activity-crosstalk with Src/Erk phosphorylation cascade. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:14783-14788.
  47. Khosla S. Estrogen, selective estrogen receptor modulators and now mechanism-specific ligands of the estrogen or androgen receptor? *Trend Pharmacol Sci* 2003;24:261-263.
  48. Macgregor JI, Jordan VC. Basic guide to the mechanism of antiestrogen action. *Pharmacol Rev* 1998;50:151-196.
  49. Delmas PD, Bjarnason NH, Mitlak BH *et al.* Effects of raloxifene on body mineral density, serum cholesterol concentrations and uterine endometrium in postmenopausal women. *N Engl J Med* 1997; 337: 1641-1647.