

Fármacos esteroides y el GM-CSF modulan la actividad de Egr-1 en células de glioma

Francisco Martínez-Flores,* Catalina Machuca-Rodríguez,** Hugo Sandoval-Zamora,*
Lucinda Aguirre-Cruz,*** Margarita Valdez-Flores,**** Hilda Villegas-Castrejón*

Resumen

Introducción: la proteína Egr-1 es un factor transcripcional de respuesta temprana a crecimiento. La regulación transcripcional de su promotor ha sido descrita como responsiva al estrés físico, a los cambios osmóticos, a la luz ultravioleta y a radiación gamma. Sin embargo, no existen reportes de los efectos de fármacos sobre la regulación del promotor y menos aún, en gliomas. Aquí se describen los efectos de fármacos esteroides y el GM-CSF sobre la actividad transcripcional del promotor Egr-1 con un adenovirus no replicativo en células de gliomas humanos.

Material y métodos: células de glioma humano de diferente grado de malignidad (CH235-GM Grado II; U373-GM Grado III; D54-GM Grado IV) fueron infectados con un adenovirus recombinante no replicativo *AdEgr-1/Luc7* y expuestos a betametasona, progesterona y b- estradiol y GM-CSF. La actividad transcripcional del promotor fue monitorizada por el gen reportero de la luciferasa, clonado corriente abajo del promotor. La actividad de luciferasa fue cuantificada mediante ensayo de luminometría.

Resultados: líneas celulares de glioma humano muestran un patrón diferencial, que correlaciona con el grado de malignidad. La línea U373-GM que en presencia de GM-CSF, presenta una activación transcripcional del promotor Egr-1 mayor, incluso de manera endógena. En esta línea celular, se observa que fármacos esteroides, tienen un efecto de regulación positiva para la activación de Egr-1, en los tiempos estudiados. En las líneas CH235-GM y D54-GM, fármacos esteroides como la progesterona, el β-estradiol y la betametasona, muestran un comportamiento pleiotrópico.

Conclusión: la respuesta de inhibición o activación del promotor Egr-1, en líneas celulares de glioma, muestra nuevos escenarios para la exploración de mecanismos de acción de fármacos esteroides sobre la regulación genética y epigenética en procesos tumorales.

Palabras clave: adenovirus, fármacos esteroides, GM-CSF, ensayo reportero, regulación transcripcional, gliomas.

Abstract

Introduction: The Egr-1 protein is a transcriptional factor responsive to early growth. Transcriptional regulation of the promoter has been described like responsive to physical stress, osmotic changes, and cellular growth marker. However, there is no report about the pharmacological effect on the transcriptional regulation in gliomas. Hereby we report the modulation of the Egr-1 promoter transcriptional activity induced by the Granulocytes Macrophages Colony Stimulating Factor (GM-CSF) and steroid drugs in human glioma cells (CH235-GM Grade II, U373-GM Grade III, D54-GM Grade IV) using a reporter system transduced by a recombinant adenoviral vector *AdEgr-1/luc7*.

Methods: Human glioma cells shows with different malignity grade (CH235-GM Grade II; U373-GM Grade III; D54-GM Grade IV) were transduced with no replicative adenoviral vector *AdEgr-1/Luc7* and exposed to drugs as progesterone, β-estradiol and betametasone, and GM-CSF. Transcriptional activity of the *egr-1* promoter was quantified by Luciferase reporter gene, cloned downstream to the tata box. Luciferase activity was quantified from whole cell proteins using luminometry assays.

Results: U373-GM cell line with GM-CSF, shows an increment on transcriptional activity of Egr-1 promoter, also in endogen way. U373-GM showed a positive regulation of Egr-1, with steroid drugs on the times analyzed. Steroid drugs as progesterone, β-estradiol and betametasone, shows a pleiotropic behavior on CH235-GM and D54-GM, glioma cell lines.

Conclusions: Inhibition or activation response of Egr-1 promoter shows new framework to explore a mechanism of action of steroid drugs on genetic and epigenetic regulation on tumoral process.

Key words: Adenoviral vector, steroid-drugs, GM-CSF, reporter assay, transcriptional regulation, glioma.

* Laboratorio de Bioterapéutica Molecular. Instituto Nacional de Rehabilitación. Secretaría de Salud, México.

** Laboratorio de Terapia Molecular, UMIEZ, FES-Zaragoza, UNAM. México.

*** Laboratorio de Neuroinmunoendocrinología. Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Dr. Manuel Velasco Suárez". Secretaría de Salud, México.

**** Departamento de Genética. Instituto Nacional de Rehabilitación. Secretaría de Salud. México.

Correspondencia:

Francisco Martínez Flores. MD, PhD.
Programa de Bioterapéutica Molecular. Banco de Piel y Tejidos. Instituto Nacional de Rehabilitación. Secretaría de Salud.
Calzada México-Xochimilco No. 283. Arenal de Guadalupe. C. P. 14389. D. F. México.
Tel.: 59991000, Ext.: 14802
Correo electrónico: fcomartinez@inr.gob.mx

Recibido para publicación: 09-01-2012

Aceptado para publicación: 12-09-2012

Introducción

Los gliomas son los tumores primarios más agresivos del sistema nervioso central y representan aproximadamente el 35% de los tumores cerebrales en México.¹ Su rápido crecimiento, la aparición de resistencia clonal por la quimioterapia, y la limitación quirúrgica por su situación anatómica, contribuyen a una reactivación tumoral y a una sobrevida no mayor a 15 meses. El crecimiento celular está asociado a la expresión de genes, a la presencia de factores de crecimiento, y de los segundos mensajeros que activan vías de señalización mitocondriales o la activación transcripcional de genes de respuesta primaria a estrés, como la proteína de respuesta temprana a crecimiento tipo 1 (también conocida como Egr-1, *Krox-24*, *TIS8*, *NFG1A*, *Zif/268*, *ZNF225*, y *GOS30*).^{2,3}

La proteína Egr-1 tiene un peso molecular de 57.5 Kilo Daltones (KD) y está constituida por 543 aminoácidos (aa). El gene codificante para Egr-1, se localiza en el cromosoma 5q31.1 con 3,824 pares de base (bp). Por su estructura química, pertenece a una familia de proteínas caracterizadas por sus motivos en dedos de Zinc^{4,5} que reconocen secuencias consenso en el promotor de varios cientos de genes (CCGG/TGGGCCG), que le confieren un mecanismo de autorregulación sobre su propio promotor a través de un sitio de unión de la proteína Egr-1 y Egr-2 (EBS). Las funciones de Egr-1 son diversas dependiendo de la estirpe celular; sin embargo, todas están asociadas al crecimiento, diferenciación y proliferación en linfocitos, fibroblastos y neuroglia.⁵ Egr-1 también regula la expresión de citocinas y receptores de superficie a crecimiento, la síntesis de factores de crecimiento, síntesis y remodelación de proteínas de matriz extracelular y proteasas en procesos de cicatrización, así como en arresto celular y apoptosis como respuesta a estrés.

Recientemente, se le ha asociado como un factor antiapoptótico en algunos modelos hematológicos, por su interacción represora con la proteína RB como un mecanismo en la supresión de tumores.^{6,7} En el sistema nervioso central, la presencia de Egr-1 está involucrada en la regulación y el control de la plasticidad neuronal,^{8,9} y su sobreexpresión está relacionada con mutaciones de p53 en células tumorales de glioma y cáncer de próstata, en donde los niveles de RNAm y la proteína Egr1 están suprimidas en glioblastomas y en células de cultivos primarios.

Las secuencias genéticas en el promotor que regulan de manera positiva la respuesta a factores exógenos, son mediadas principalmente por 5 elementos de respuesta a suero (SRE), secuencias de unión activadas por AMP cíclico (CREB's) o a través de sitios de unión de la proteína Egr-1 (EBS) además de sitios de unión del factor transcripcional SP1.^{4,10,11} También se ha reportado que la actividad transcripcional de Egr-1 puede ser inducida por la luz ultravioleta (UV) y radiación gamma a través de secuencias motivo conocidos como cajas CArG(CC(A+T ricas en Timina)6GG).¹²⁻¹⁴

Por su parte, los esteroides son un grupo de fármacos derivados de un núcleo central de colesterol, que se encuentran de manera endógena en el organismo (hormonas) o de origen sintético (fármacos esteroides). Los mecanismos de acción de las hormonas esteroides, son mediados por un receptor específico, nuclear o citoplásmico, que permiten la translocación nuclear y la expresión o represión de genes blanco.¹⁵ En el caso de los corticosteroides (derivados del cortisol como glucocorticoides y mineralocorticoides), el mecanismo de acción se basa esencialmente en la unión de un receptor citoplasmático que trasloca al núcleo, y que es capaz de

unirse a secuencias genéticas de consenso denominadas como elementos de respuestas a esteroides (GRE). Recientemente estos receptores han sido descritos en células de glioma con efecto sobre el crecimiento celular.^{15,16} Estas secuencias también se encuentran en promotores que regulan la actividad de proteína cinasas o vías de señalización mitogénicas (*Fos*, *Jun*, *Egr-1*) o de las cinasas activadoras de mitógenos (MAPquinas), y que también son activados por Egr-11 en neuronas.^{4,15-17}

Sakamoto *et al.*, (1994) han caracterizado un fragmento de -600 pb del sitio de inicio de la transcripción del gen Egr-1 (5'), y su regulación por el factor estimulador de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) y de la interleucina 3 (IL-3) en células hematológicas.¹⁸ Esta regulación también ha sido descrito en las células C6 de glioma murino por una vía no genómica: Raf/MEK1/ErK/Elk1.^{4,17,19} Sin embargo, la modulación transcripcional inducida por fármacos y factores de crecimiento, no está descrita en gliomas humanos y pocos estudios han explorado los efectos de los fármacos esteroides sobre la actividad y la regulación transcripcional de Egr-1.

Debido a que el promotor o región reguladora de la expresión de la proteína ha sido descrito como responsivo a factores físicos, químicos, farmacológicos y otras proteínas o factores de crecimiento (FGF-2 EGF-1, k-Ras) el *objetivo de este estudio* es determinar el efecto de fármacos esteroides y de GM-CSF sobre la regulación del promotor Egr-1 en células de glioma humano (CH235-GM grado II; U373-GM grado III; D54-GM grado IV).

Se busca determinar el papel de los fármacos esteroides y del factor estimulador de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), así como su empleo como coadyuvantes de la terapia antineoplásica mediante la modulación de la actividad transcripcional del promotor Egr-1 en células de glioma humano, los cuales representan uno de los tipos de cáncer con mas alto índice de proliferación y crecimiento.

Materiales y métodos

Diseño experimental

Para llevar a cabo los ensayos de respuesta a fármacos en células de glioma, se empleó un sistema reportero por tecnología del ADN recombinante construyendo un casete que contiene la secuencia de -600 pb de la región promotora de gen Egr-1 al sitio de inicio de la transcripción del gen de la *Renilla luciferasa*, seguida de una secuencia de poliadenilación (Figura 1A). Este casete se incorporó a una plataforma adenoviral, para transferir el casete a las células tumorales por exposición o infección al adenovirus no replicativo. Las

células infectadas fueron expuestas a fármacos y en diferentes tiempos, se obtuvieron proteínas totales para realizar ensayos de actividad de luciferasa. Debido a que las células humanas no expresan de manera constitutiva la luciferasa, los extractos totales que son capaces de hidrolizar la luciferina en presencia de ATP son directamente proporcionales al efecto regulador positivo o negativo del fármaco, en comparación de los niveles basales sin fármacos. La evaluación cuantitativa del efecto del fármaco sobre el promotor, se realizó con un luminómetro expresado en cuentas lumínicas por segundo (CL/segundo) (Figura 1B).

La transferencia de genes mediada por adenovirus son altamente eficiente, y reproducibles al conferir una expresión del transgen mayor al 90% de las células infectadas, lo cual depende de la cantidad de partículas infectantes y del tropismo del virus.

Diseño y construcción de los plásmidos adenovirales no replicativos

El adenovirus recombinante no replicativo ($\Delta 3$) *AdEgr-1/Luc7*, fue diseñado por ingeniería genética a partir del

sistema *AdEasy*, mediante recombinación homóloga en bacterias *DH5 α* (Rec A+). Un fragmento de -600 pb del extremo 5' del sitio de inicio de la transcripción del promotor Egr-1 humano fue subclonado en el vector *pShuttle* (Figura 1). El vector resultante fue replicado en bacterias DH10B (Invitrogen, Corp) y usado para subclonar el gen de la *Renilla luciferasa*, seguido de un fragmento de poliadenilación de 350 pb (SMV40-polyA). La construcción resultante *pShuttle-Egr1/Luc* fue linearizado con la enzima *Pme I* (New England Biolabs, USA) y purificado para recombinación homóloga en bacterias *DH5 α* con el genoma del adenovirus tipo 5- $\Delta 3$ (*AdEasy 1*) usando la técnica de recombinación homóloga en bacterias descrita por He et al.²⁰ Las clonas resultantes seleccionadas, fueron crecidas en medio LB con kanamicina (50 μ g/ml) y los plásmidos fueron aislados en preparaciones mini para análisis por mapas de restricción. Una clona seleccionada y nombrada *pAdEgr-1/Luc7*, fue secuenciada para verificar la orientación del casete subclonado y posteriormente purificado a gran escala, con resinas de intercambio iónico y libre de endotoxinas (Endofree Giga Kit DNA, Qiagen, Alemania) para empaquetamiento viral en células HEK-293.

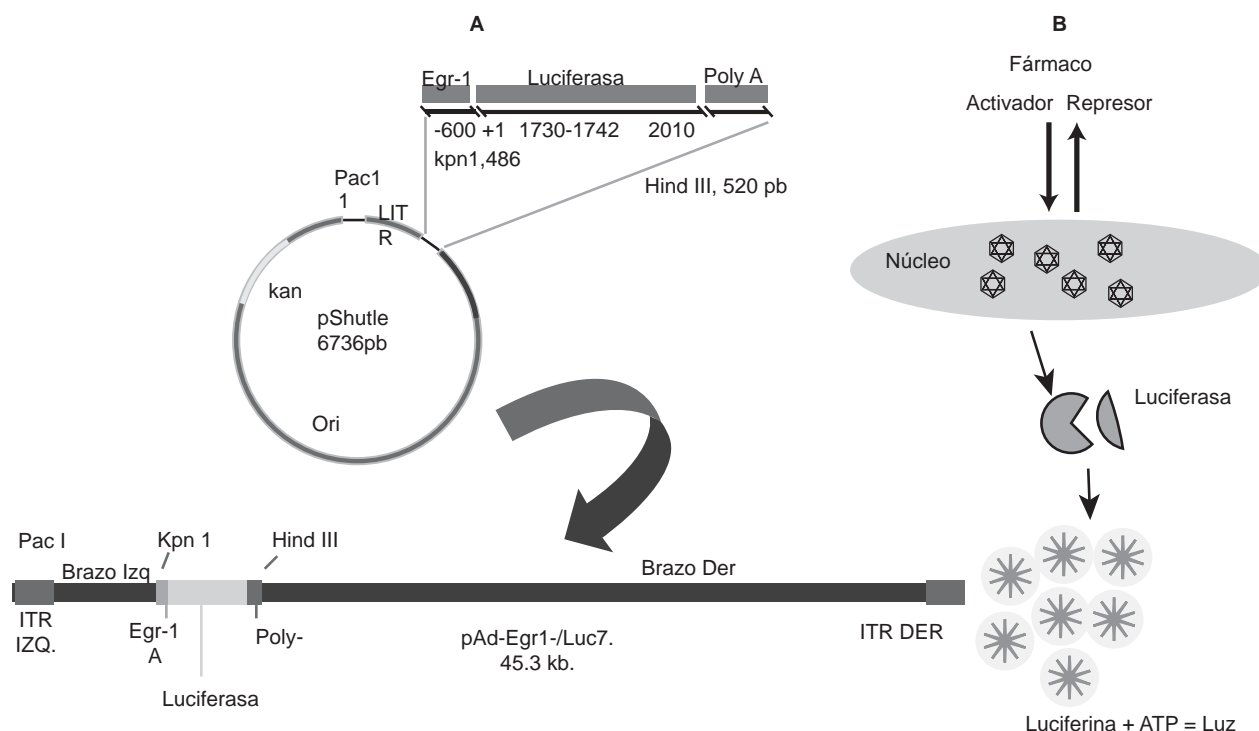


Figura 1A. Construcción y diseño del plásmido *AdEgr-1/Luc7*. Estructura del casete subclonado en *pShuttle* en los sitio *Kpn1/Hind III*, el plásmido contiene un gen de resistencia a kanamicina, el cual es transferido durante la recombinación homóloga al plásmido adenoviral resultando en el plásmido *pAdEgr-1/Luc7*. **Figura 1B.** Diagrama que ilustra el modelo experimental para determinar el efecto de fármacos sobre la actividad transcripcional de Egr-1 en células de glioma.

Cultivo de células HEK-293

Las células HEK-293 fueron crecidas en medio HyQS-FM4HEK-293 (Hyclone Corp, USA) suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado por calor (FBS-Hyclone Corp, USA), antibiótico/antimicótico (Penicilina G 10 mil U/ml, 100 µg de estreptomina/ml, y 25 µg de anfotericina B/ml) e incubadas de acuerdo con las instrucciones de la ATCC (American Type Culture Collection, USA) y estandarizadas en el laboratorio.²¹

Generación a gran escala del inóculo inicial del adenovirus recombinante AdEgr-1/Luc7

Se usaron 10 µg del plásmido *pAdEgr-1/Luc7* linearizado con la enzima *Pme I* y libre de endotoxinas, para transfectar 5×10^5 células HEK-293, empleando el método de encapsulamiento por liposomas (Transfectene Qiagen, Alemania). Las células transfectadas se mantuvieron en cultivo hasta la aparición de placas líticas en la monocapa (día 7). Al término del día 10, se colectaron y lisaron para ser empleados en infecciones subsecuentes hasta la producción a gran escala de viriones recombinantes no replicativos de *AdEgr-1/Luc7* de acuerdo a Martínez Flores *et al.*²²

Producción a gran escala del adenovirus recombinante AdEgr-1/Luc7

La producción de vectores adenovirales, se basó en el protocolo de purificación de adenovirus recombinante para aplicaciones *in vivo*. Para ello, se sembraron 250×10^6 de células HEK-293 en las condiciones antes descritas. Cuando las células alcanzaron una confluencia del 90%, se infectaron durante 2 horas con un MOI de 10 en medio reducido de suero fetal bovino. Las células infectadas se monitorizaron por microscopía óptica, hasta la aparición de efecto citopático en más del 80% a las 48 horas. Después de este tiempo, las células fueron colectadas, concentradas y lisadas por 3 ciclos de choque térmico con baño de nitrógeno líquido, en campana de flujo laminar Herasafe clase II-AB (Kendro-Heraeus, Alemania). Los lisados totales (~ 10ml) fueron mantenidos en hielo y purificados por ultracentrifugación con el método de gradientes de cloruro de cesio (1.3 G/ml y 1.5 G/ml) a 28 mil G, a 4°C y durante 12 horas (WX-100 Thermo Corp, USA), con el objeto de separar los viriones maduros de los inmaduros y los detritus celulares. Los viriones se aislaron por punción estéril y se dializaron (en presencia de magnesio y 5 mM de HEPES a 4°C) por 12 horas, usando una membrana de 10,000 MWCO (Pierce bioscience, USA). Los viriones recombinantes purificados fueron almacenados en solución de preservación viral (1%

de albumina y 5 mM de HEPES) a -70°C. La eficiencia de la infectividad y la titulación de las partículas virales infectantes, se determinó por ensayo de placa en monocapas de células HEK-293 a diluciones seriadas (10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} , 10^{-11}) y por la lectura de la densidad óptica del dializado a 260 nm, de acuerdo a las condiciones estandarizadas de rutina en el laboratorio.²³

Cultivo de células de glioma

Las líneas celulares de glioma humano con diferente grado de malignidad: CH235-MG Grado II, U373-MG Grado III y D54-MG Grado IV, fueron crecidas en medio de cultivo D-MEM alta glucosa, suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado por calor y concentraciones estándares de antibiótico-antimicótico. Los cultivos se mantuvieron a una confluencia menor al 70%, en un ambiente con 5% de CO₂, 100% de humedad y 37°C.

Determinación del múltiplo de infección (MOI) óptimo en células de glioma infectado con el adenovirus AdCMV-GFP

Para determinar la cantidad óptima de adenovirus recombinante con transducción eficiente en las células de glioma, se sembraron 3×10^5 células en cajas de 6 pozos (Costar, Madison USA) hasta alcanzar una confluencia del 90%. Al inicio del ensayo, las células fueron lavadas en solución amortiguadora de fosfatos (con Ca⁺⁺ y Mg⁺⁺, pH 7.4) y se infectaron con 25, 50, 75, 100 y 200 MOI's con el adenovirus reportero *AdCMV-GFP* en medio reducido en suero. Al término de dos horas de exposición, el medio infectante fue remplazado por medio fresco y se mantuvieron en condiciones estándares de cultivo por 24 horas. Para documentar la eficiencia de la infección, se buscó la señal de la proteína verde fluorescente (GFP) usando un equipo Axioplan 2 (Carl Zeiss, Alemania). La proteína verde fluorescente emite una señal luminosa excitable a 488 nm en las células infectadas por el adenovirus *AdCMV-GFP* (Figura 2).

Ensayo reportero de luciferasa inducido por esteroides

Las células de glioma se sembraron en cajas de 12 pozos (1×10^5 células/pozo) y mantuvieron en condiciones normales de cultivo. Después de 12 horas, el medio de cultivo fue remplazado por medio D-MEM con 1% de suero fetal bovino tratado con carbón activado y se mantuvieron en estas condiciones por 24 horas. Al término de este tiempo, las células se infectaron con *AdEgr-1/Luc7*, usando un MOI de 50 (PV/célula) en medio HyQCDM4Retino bajo en suero (Hyclone, Corp) con 2% de suero fetal bovino para evitar la

inactivación de los viriones. Posteriormente, las células se lavaron y mantuvieron en medio D-MEM (Gibco-Invitrogen, USA) con 1% de suero fetal bovino tratado con carbón activado durante 24 horas posteriores a la infección, para eliminar la presencia de hormonas esteroides. Los ensayos de inducción se realizaron por triplicado a las 24 horas post-infección con el *AdEgr-1/Luc7* y se expusieron a betametasona (100 ng/ml); β -estradiol (100 ng/ml) y progesterona (50 ng/ml) en medio D-MEM con 1% de suero fetal bovino tratado con carbón activado. Las proteínas totales fueron extraídas a diferentes tiempos (1, 2, 6 y 12 horas) para determinar la actividad del promotor basado en la actividad de la luciferasa como proteína reportero.

Ensayo reportero de luciferasa inducido por GM-CSF

Los ensayos de inducción por GM-CSF, se realizaron con la misma preparación celular y se expusieron en medio D-MEM a diferentes concentraciones de GM-CSF (1, 5, 10, y 20 ng/ml). Al término de los tiempos de exposición (1, 3, 6 y 12 horas) las células se lavaron con D-PBS, pH 7.4 (Gibco-Invitrogen, USA) y se lisaron para la extracción de proteínas totales.

Extracción de proteínas totales

La extracción de proteínas totales de las células expuestas a fármacos se realizó de la siguiente manera: previo lavado con PBS a 37°C (Invitrogen Corp.), las células se lisaron con 300 μ l de solución de lisis (Glo-Cell lisis Buffer, Promega Corp) a temperatura ambiente durante 5 minutos. El

lisado fue colectado en un microtubo estéril, agitado por 1 minuto e inmediatamente se centrifugó a 5 mil G a 4°C. El sobrenadante fue decantado y almacenado a -20°C hasta su uso en los ensayos de luminometría.

Ensayos de luminometría

Los ensayos de luminometría se realizaron por triplicado con 50 μ l del lisado celular con una relación de 1:1 volúmenes de sustrato Glo-Luciferase, de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Glo-Luciferase system, Promega, USA). La mezcla se incubó durante 10 minutos a 23°C en placas de 96 pozos para luminometría. (Costar ware, USA.). Inmediatamente, la reacción fue cuantificada en un luminómetro (DTX-800 Beckman Coulter). La luciferasa presente en el extracto proteico, hidroliza la luciferina en presencia de ATP y genera una señal luminosa identificada por el sensor del multidetector y se expresa en cuentas lumínicas/segundo (CL/s). Las cuentas lumínicas por segundo fueron ajustadas a la concentración de proteínas para obtener los datos reales de actividad de luciferasa expresada por el promotor Egr-1 de las células infectadas con *AdEgr-1/Luc7*. El análisis de datos se realizó con el programa Multimode Analysis Software (Beckman Coulter, USA).

Resultados

La introducción de elementos genéticos a las células clásicamente se ha realizado por métodos químicos.²² Sin embargo, la transferencia de genes mediada por adenovirus no replicativo (NRAd) muestra una mayor eficiencia, con una expresión temporal en modelos tanto *in vitro* como *in vivo*. Los estudios de la regulación funcional de los promotores, se realizan con la transferencia de un sistema reportero que permite evaluar la activación/represión transcripcional (switch on/switch off) de un promotor. En el caso de la construcción del adenovirus *AdEgr-1/Luc7*, el casete transducido por el adenovirus no replicativo es de localización nuclear y episomal. Adicionalmente, su sitio dentro del genoma adenoviral le permite ser responsivo a las señales y factores que activan de manera endógena al promotor y traduce su respuesta en la expresión de la luciferasa.

El plásmido recombinante pAdEgr-1/Luc7 fue empaquetado de manera eficiente en las células HEK-293

La construcción del casete reportero se realizó por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), usando oligonucleótidos cebadores con secuencias sintéticas pa-

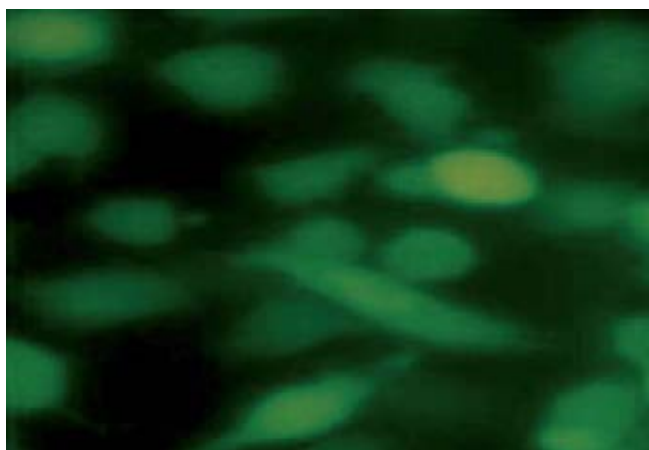


Figura 2. Células D54-GM, grado IV transducidas con AdCMV-GFP. Imagen de fluorescencia de las células D54-GM infectadas con el *AdCMV-GFP* que expresan GFP a las 24 horas post-infección con un múltiplo de infección de 50 (MOI) (Microscopia de fluorescencia 488 nm).

lindrómicas de *Hind III* y *Kpn I* (Figura 1). El adenovirus construido e ilustrado en el diagrama de la figura 1A, muestra la orientación del casete reportero con el promotor de Egr-1, dentro de la construcción final después de la recombinación homóloga. El empaquetamiento de los viriones, fue corroborado por microscopía electrónica de transmisión de las células humanas derivadas del mesonefros embrionario (HEK-293), las cuales expresan de manera constitutiva la subunidad transcripcional E1, lo que demuestra que el genoma del *AdEgr-1/Luc7*, es responsivo para iniciar la señal del empaquetamiento adenoviral. De la misma manera los viriones obtenidos también mostraron capacidad infectiva, documentada por la generación de zonas líticas en los ensayos de placa en monocapa de células HEK-293. Los viriones de *AdCMV-GFP* generados y purificados por el mismo método, también mostraron eficiencia en la infección de las células de glioma. El stock viral de *AdEgr-1/Luc7* fue obtenido de manera paralela y reproducible de acuerdo a lo reportado por He et al.²⁰

El adenovirus recombinante AdCMV-GFP fue capaz de infectar eficientemente las células de glioma

Debido a que la adsorción del adenovirus requiere de un mecanismo de internalización mediado principalmente por el receptor CAR (Coxsackie-Adenovirus Receptor), la infección es dependiente de la presencia y número de receptores en la superficie de cada estirpe celular.²² Para determinar la eficiencia de la transferencia del sistema reportero por el adenovirus, se realizaron ensayos de infectividad con el adenovirus reportero (*AdCMV-GFP*) basado en el mismo sistema. Como primer paso, fue fundamental determinar la dosis óptima de las líneas celulares CH235-GM Grado II, U373-GM Grado III y D54-GM Grado IV, con el objeto de evitar el efecto citotóxico. Las células infectadas con el *AdCMV-GFP* (MOI 25, 50, 75, 100 y 200) mostraron una expresión eficiente de la GFP a las 24 horas. Sin embargo, el efecto tóxico del virus fue directamente proporcional al incremento del número de viriones (datos no mostrados). El análisis por microscopía de fluorescencia determinó que el MOI óptimo, fue de 50 partículas virales por célula en las tres líneas celulares (Figura 2). Basados en este dato, todos los ensayos se realizaron con un MOI de 50.

Efecto de GM-CSF en células de glioma transducidos con AdEgr-1/Luc7

GM-CSF induce actividad transcripcional del promotor Egr-1 solo en células U373-GM. La exposición a GM-CSF no tuvo efecto significativo sobre la línea CH235-GM gra-

do II, en la curva de tiempo comparado con la actividad basal de las células de control (-GM-CSF). La actividad de luciferasa en las células tratadas, se mantuvo entre 40 y 304 CL/segundos en las diferentes dosis de exposición. La actividad más alta se encontró a las 12 horas post-exposición (Figura 3). En el caso de las células D54-GM grado IV, tampoco se encontró una actividad importante del promotor en los tiempos analizados. Interesantemente, la línea U373-GM grado III, mostró una actividad basal (-GM-CSF) mayor que las líneas CH235-GM grado II y D54-GM grado IV (Figura 3). La actividad de luciferasa de las células U373-GM en presencia de GM-CSF, se encontró por arriba de la actividad basal del promotor (células control sin fármaco) a las 3, 6 y 12 horas, con un pico máximo de expresión (hasta 15 veces) a las 6 horas (3,220 CL/segundos). Esto se traduce como un efecto de regulación positiva sobre la actividad transcripcional del promotor Egr-1 de 2.3 veces en relación a la actividad basal.

La expresión de luciferasa inducida por fármacos esteroides en las células de glioma transformados con AdEgr-1/Luc7

Para determinar el efecto de los fármacos esteroideos sobre la actividad transcripcional del promotor de Egr-1, las células fueron previamente infectadas con el adenovirus *AdEgr-1/Luc7* y mantenidas en concentraciones bajas de suero tratado con carbón activado con objeto de llevar la actividad del promotor en un medio sin elementos de respuesta a suero u hormonas esteroideas. El día del ensayo de inducción, las células se expusieron a medio fresco con los diferentes fármacos a dosis conocidas y estandarizadas (datos no mostrados). Los ensayos se detuvieron a diferentes tiempos 1, 3, 6 y 12 horas. Inmediatamente las células fueron lavadas rápidamente con PBS a 37°C y lisadas con 300 microlitros de cell Lysis Buffer para extracción de las proteínas totales. Las proteínas fueron almacenadas a -30°C hasta la realización de los ensayos de actividad de luciferasa y su cuantificación por luminometría. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

Efecto de fármacos esteroides en las células CH235-GM grado II

La actividad basal del promotor en las células CH235-GM infectadas con *AdEgr-1/Luc7*, fue de 346.49; 1,989.24; 3,220.84 y 4,156.68 CL/segundos a la 1, 3, 6 y 12 horas respectivamente; la exposición a betametasona mostró un patrón inhibitorio con un pico máximo a las 6 horas (*Beta-metasona*: 105.81; 707.85; 3,472.45; 283.78 CL/segundos, a la 1, 3, 6 y 12 horas respectivamente). La exposición a β -estradiol, también muestra el mismo patrón inhibitorio

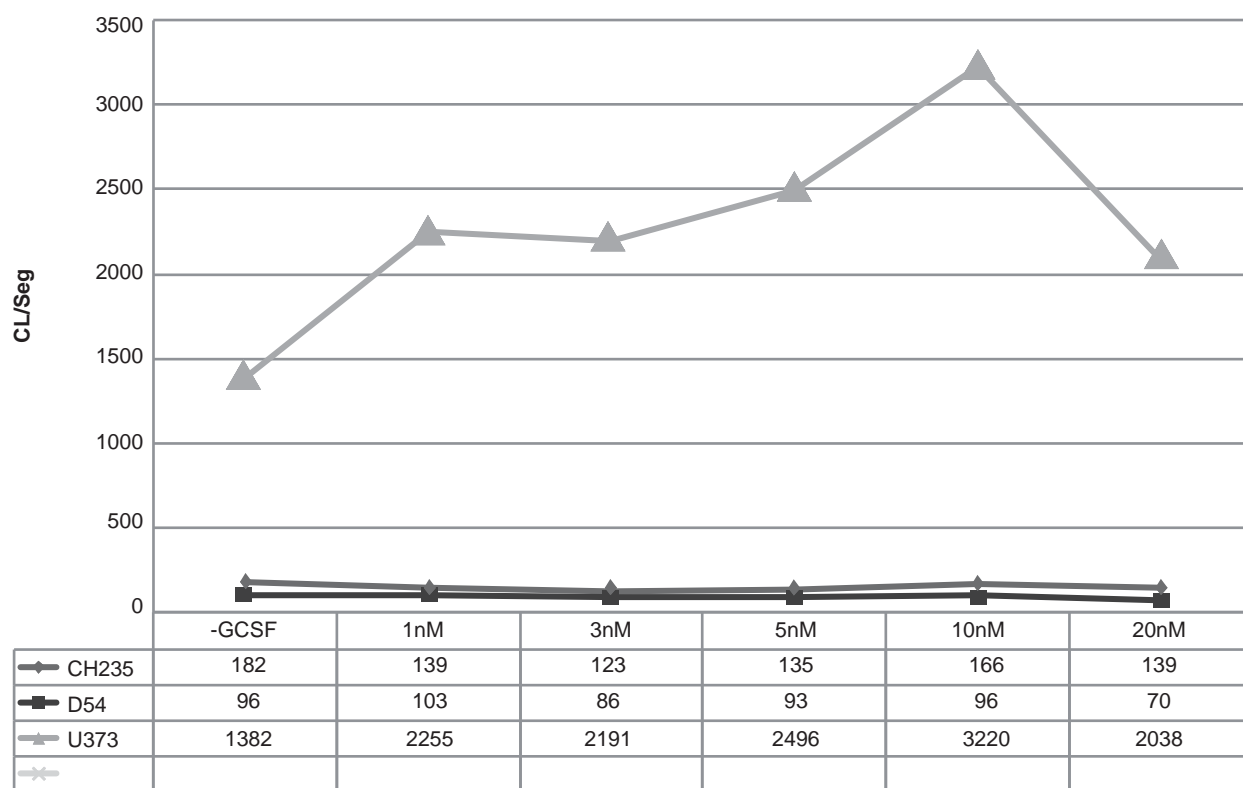


Figura 3. Efecto de GM-CSF sobre el promotor de Egr-1 en células de glioma humano.

Las células de las líneas CH235-GM grado II, U373-GM grado III y D54-GM IV fueron expuestas a GM-CSF a concentraciones crecientes de 1 ng, 3 ng, 5 ng, 10 ng y 20 ng. La luminometría fue medida a los tiempos 1, 3, 6 y 12 horas, resalta la actividad endógena de las células U373-GM mayor que la de las líneas CH235-GM y D54-GM.

en esta línea celular y se hace más evidente a las 12 horas (β -estradiol 1,330.03 CL/segundos) comparado con la actividad basal (de 4,156.68 CL/segundos). La progesterona, no mostró efectos significativos sobre la actividad del promotor Egr-1 en los tiempos ensayados para las células CH235-GM; (*Progesterona*: 115.16; 630.75; 3,546.99; 4,534.70 CL/segundos a la 1, 3, 6 y 12 horas respectivamente), un efecto inhibitorio sobre la expresión Egr-1, se encontró a las 3 horas comparado con las células de control; sin embargo la actividad aumenta a las 6 y 12 horas. (Figura 4)

Efecto de células esteroideas en células U373-GM grado III

La línea celular U373-GM mostró una actividad basal sin fármacos de 137.50; 702.19; 1,750.01; 1,814.89 CL/segundos a la 1, 3, 6 y 12 horas respectivamente. La exposición a betametasona mostró una actividad de luciferasa (*Betametasona*: 157.63; 5,740.83; 2,923.92 y 1,247.87 CL/segundos a las 1, 3, 6 y 12 horas); con un pico máximo a las 6 horas por encima de la actividad basal (Figura 5). La

exposición a β -estradiol mantuvo un patrón por encima de la actividad basal principalmente a las 6 horas (*β -estradiol*: 136.74; 1,227.40; 2,601.40 y 2,054.23 CL/seg a la 1, 3, 6 y 12 horas). El patrón de inducción por progesterona se observó a las 6 horas (*Progesterona*: 274.51; 733.20; 3,145.1 y 1,420.65 CL/segundos a la 1, 3, 6 y 12 horas respectivamente).

Efecto de fármacos esteroideos en células D54-GM grado IV

La actividad basal de las células sin exposición a fármacos mostró un incremento progresivo de 124.55; 2,051.97; 3,118.53; 4,297.70 CL/segundos a la 1, 3, 6, y 12 horas respectivamente. La betametasona (*Betametasona*: 157.63; 574.83; 2,923.92 y 1,247.87 CL/segundos a la 1, 3, 6, y 12 horas); el β -estradiol (*β -estradiol*: 136.274; 1,227.40; 2,601.40; 2,054.23 CL/segundos a la 1, 3, 6, y 12 horas) y la progesterona (*Progesterona*: 274.51; 733.20; 3,145.14; 1,520.65 CL/segundos a la 1, 3, 6 y 12 horas) no mostraron cambios significativos en relación a la actividad basal (Figura 6).

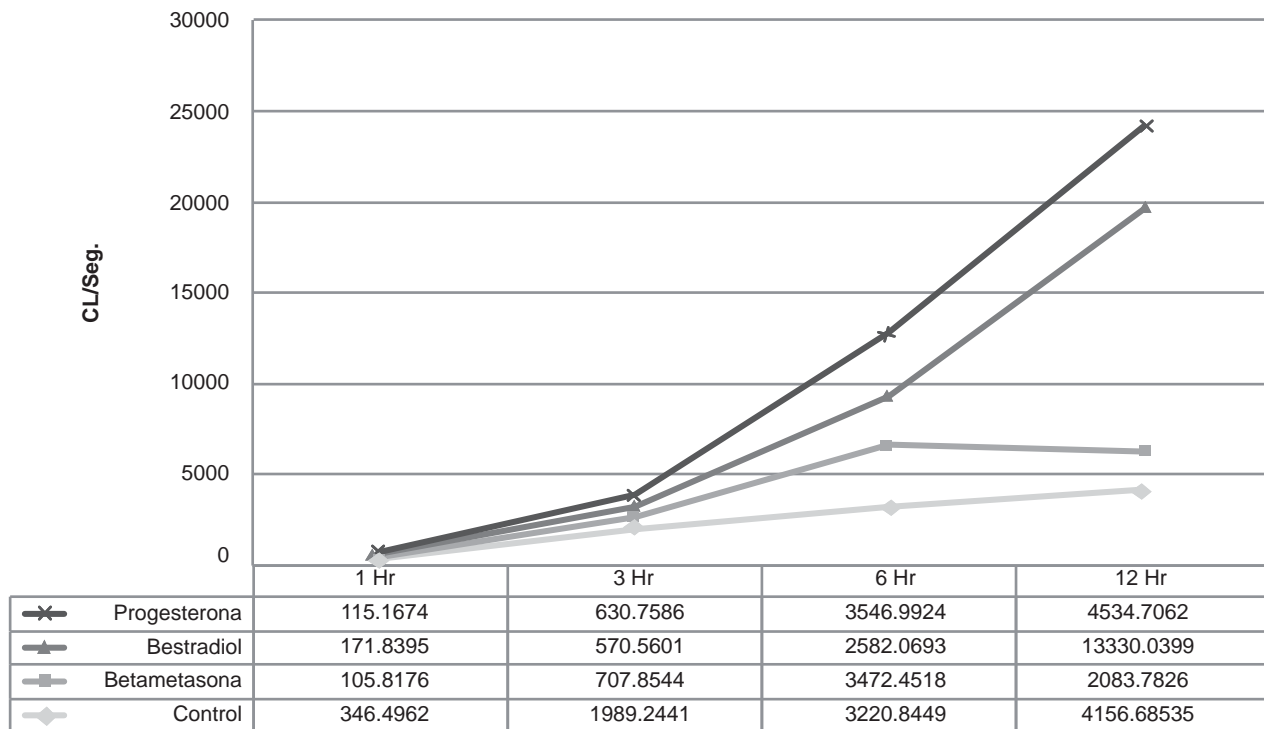


Figura 4. Efecto de diferentes fármacos esteroides sobre el promotor de Egr-1 en la línea celular CH235-GM, grado II.

La presencia de betametasona muestra una actividad por debajo de la basal, excepto a las 6 horas, (3,472.45 y 2,083.48 CL/Seg a la 1, 3, 6 y 12 horas respectivamente). Se observa una disminución de la actividad del promotor en presencia de β -estradiol. La progesterona muestra un patrón ligeramente progresivo después de las 6 horas.

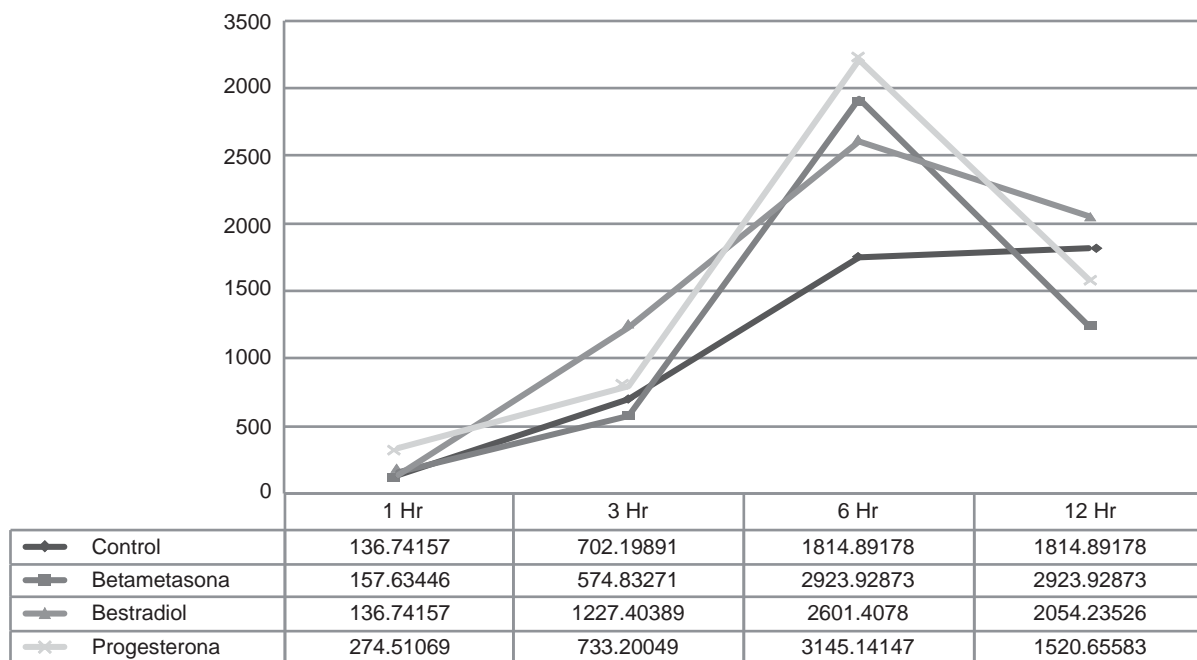


Figura 5. Efecto de los fármacos esteroides sobre el promotor de Egr-1 en la línea celular U373-GM, grado III.

La actividad transcripcional del promotor Egr-1 en las células U373-GM expuestas a betametasona, mostraron un pico máximo de 2,923.92 CL/Seg. El β -estradiol muestra una regulación positiva desde las 3 horas y un pico máximo a las 6 horas. Las células expuestas a progesterona, también alcanzan este efecto a las 6 horas.

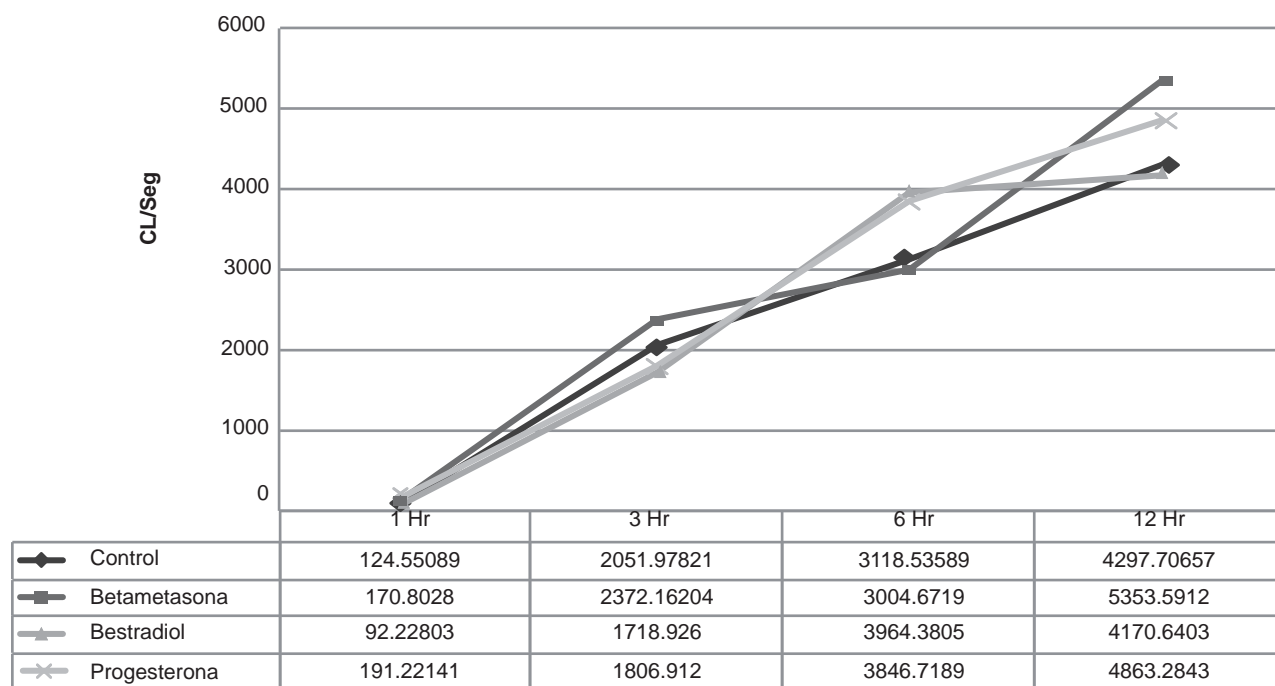


Figura 6. Efecto de fármacos esteroides sobre el promotor de Egr-1 en la línea celular D54-GM, grado IV.

Las células D54-GM, expuestas a betametasona, β -estradiol y progesterona no mostraron actividad significativa diferente con respecto al control.

Discusión

El crecimiento celular, es un fenómeno complejo en la biología celular; que se vuelve más complejo en la biología de las células neoplásicas. Se ha reportado que la resistencia de las células neoplásicas es el resultado de una selección clonal, inducida en parte como respuesta a la citodefensa a los agentes quimioterapéuticos, antineoplásicos, radioterapia e incluso a factores parácrinos y autócrinos.¹⁸ Si bien el estrés físico, como la radiación, la luz ultravioleta, la temperatura y fenómenos osmóticos descritos como inductores de genes de respuesta celular temprana que activan vías mitogénicas (MAPKinasas) o antiapoptóticas mediante el bloqueo directo de p53;⁷⁻⁹ es factible suponer que esta respuesta se presenta en condiciones neoplásicas que pudieran repercutir en la selección clonal y por lo tanto, al crecimiento tumoral. La coactivación de vías de señalización y la transcripción de genes relacionadas con el crecimiento por la vía no genética está descrita en células tumorales de glioma.^{15,16} La búsqueda de factores de transcripción como respuesta a estos eventos, ha sido descrita para otros genes, incluyendo la del factor transcripcional Egr-1.²⁴

En nuestro modelo, los extractos proteicos de células infectadas con *AdEgr-1/Luc7*, expuestos a diferentes dosis

de GM-CSF, no mostraron una actividad significativa en las células CH235-GM grado II y D54-GM grado IV. Sin embargo, las células U373-GM grado III, expuestas a GM-CSF, mostraron incremento de la actividad transcripcional del promotor Egr-1, con incremento de la actividad de luciferasa (Figura 4).

Es interesante que la falta de respuesta de GM-CSF en las células de menor grado de malignidad, (CH235-GM Grado II) puede explicarse por la no intervención del GM-CSF, en las vías de activación mitogénicas o a bloqueo autócrino de los elementos de respuesta a Egr-1 sobre su propio promotor. La activación del promotor en las células U373-GM, se puede interpretar como la participación del promotor de Egr-1, de manera autorregulada; Este hallazgo es congruente con los datos reportados por Mueller *et al.*,²⁵ quienes han descrito una regulación autócrina positiva de GM-CSF y su receptor en diferentes muestras de gliomas humanos, lo que correlaciona con el grado de malignidad del tumor. Considerando que U373-GM grado III, es un tumor de alto grado de malignidad, nuestros datos sugieren un mecanismo intrínseco parecido. Por otra parte, la expresión constante del promotor Egr-1 también puede deberse a que la cascada de transducción de señales, que activan al promotor de manera basal en esta línea, permite una expresión incrementada de la luciferasa inducida por una vía no genética, como es la vía de Raf/MEK1/ErK/Elk1.^{5,18} La activación del promo-

tor Egr-1 estudiado en este reporte, aporta elementos que sugieren esta hipótesis. Adicionalmente, la interacción de Egr-1 con otras proteínas como p53, también podrían estar asociada al fenómeno observado en las células U373-GM. Es posible que las mutaciones asociadas a p53 y descritas en esta línea celular no permitan la interacción con Egr-1, para regular la actividad de ambos, y que pudieran estar presentes en este tipo de astrocitoma (astrocitoma anaplásico) tal como ha sido descrito en cáncer de próstata.²⁶⁻²⁸

Por otro lado, no se ha involucrado la activación transcripcional de Egr-1 como elemento responsivo a hormonas esteroides. Se sabe que algunas líneas celulares son responsivas en mayor o menor grado por la presencia de los receptores a estrógenos o progesterona; sin embargo, no se sabe cuáles sean los mecanismos que participen en ellos.^{15,16} Adicionalmente, los reportes recientes muestran un panorama de respuesta hormonal de diferentes líneas celulares dependiente del contexto fisiológico o patológico,^{16,29} la presencia y número de receptores a progesterona y/o estrógenos.² Este es uno de los primeros reportes que describen una asociación de fármacos esteroides y GM-CSF con la activación transcripcional sobre el promotor de un factor transcripcional de respuesta temprana a crecimiento como Egr-1.

Conclusiones y perspectivas

La respuesta de inhibición o activación transcripcional del promotor Egr-1 en respuesta de los fármacos estudiados en este trabajo, muestra nuevos escenarios para la exploración de los efectos epigenéticos de los fármacos esteroides sobre la regulación genética y en neoplasias cerebrales. La farmacogenómica muestra aspectos que pueden romper con los paradigmas tradicionales de mecanismos de acción de hormona y fármacos

Este reporte también permite una perspectiva para el análisis de la transducción de señales (receptores, segundos mensajeros y activadores) en el desarrollo tumoral de gliomas primarios y determinar la participación de los esteroides y derivados, así como su interacción de otras vías de señalización celular^{30,31} en un contexto fisiopatológico agudo o de regulación de la proliferación o muerte celular.^{32,33} Se requieren estudios posteriores para determinar la inhibición o activación transcripcional del promotor Egr-1, que se traduzca a una respuesta sobre la velocidad de la proliferación y diferenciación celular, así como para determinar la posible evaluación de la actividad del promotor endógeno tumoral como marcador de crecimiento, proliferación y progresión de la enfermedad. Adicionalmente su asociación con otras proteínas como p53, k-ras, VGF1 o bcl-2, permitirán la asociación de mutaciones o vías de señalización altera-

das que confluyen en la actividad del promotor en células tumorales.³⁴

El sistema reportero transducido mediante un vector adenoviral no replicativo empleado en este reporte, puede ser traspolado a otros modelos para estudiar la regulación transcripcional de genes relacionados con el crecimiento tumoral y la respuesta a agentes físicos tales como la radiación gamma o la luz ultravioleta, con el objeto de estudiar las posibles interacciones o respuestas celulares en presencia de un inductor de estrés celular; mas aún la posibilidad de identificar mecanismos de regulación transcripcional del promotor, permite el conocimiento de reguladores positivos para conducir la expresión de diversos genes de interés en estrategias de terapia con genes. Los reportes previos en el uso del promotor como regulador potencial para la expresión de proteínas, incluye desde las pro-apoptóticas (p53, Bax 1) o la expresión de genes suicidas (timidina cinasas, HSV-TK, desaminasa de citosina), o factores que modulan la diferenciación celular, ofrece un escenario prometedor de aplicaciones bioterpéutica con regulación fina y precisa de la expresión génica empleando fármacos conocidos en la práctica clínica y la posibilidad de explorar otras aplicaciones como la diferenciación, cicatrización y la regeneración de tejidos. Un sueño mucho tiempo acariciado por la terapia génica.

Agradecimientos a:

Dra. Khatleen Sakamoto. División de Hematología/Oncología; del Children's Hospital of UCLA. Los Angeles CA, USA. Por proporcionar la secuencia del promotor Egr-1 humano usado en este reporte.

Dr. Bert Vogelstein, de la Universidad John's Hopkins, USA, por el soporte técnico-científico y la donación del sistema *AdEasy*.

Este proyecto ha sido financiado por el ICYT-DF a través del proyecto *PIFUT08-169*, el CONACYT y la Secretaría de Salud a través del proyecto *FOSIS-Salud-2011-1-161624*.

Referencias

1. Hernández-Reyna R, Medellín-Sánchez R, Cerda-Flores RM, Calderón-Garcidueñas AL. Survival pronostic factors in Mexican patients with multiforme glioblastoma. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc* 2010;48(2):121-126.
2. Sakamoto KM, Bardeleben C, Yates KE, Raines MA, Golde DW, Gasson JC. 5' upstream sequence and genomic structure of the human primary response gene, EGR-1/TIS8. *Oncogene* 1991;6(5):867-871.
3. Aicher WK, Sakamoto KM, Hack A, Eibel H. Analysis of functional elements in the human Egr-1 gene promoter. *Rheumatol Int* 1999;18(5-6):207-214.
4. Rolli M, Kotlyarov A, Sakamoto KM, Gaestel M, Neiningner A. Stress-induced Stimulation of Early Growth Response Gene-1 by

- p38/Stress-activated Protein Kinase 2 Is Mediated by a cAMP-responsive Promoter Element in a MAPKAP kinase 2-independent Manner. *J Biol Chem* 1999;274:19559-19564.
5. Joseph LJ, Le Beau MM, Jamieson GA Jr, Acharya S, Shows TB, Rowley JD, et al. Molecular cloning, sequencing, and mapping of EGR2, a human early growth response gene encoding a protein with "zinc-binding finger" structure. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85(19):7164-7168.
6. Hsu H, Rainov NG, Quinones A, Eling DJ, Sakamoto KM, Spear MA. Combined radiation and Cytochrome CYP4B1/4-ipomeanol gene therapy using the EGR1 promoter. *Anticancer Res* 2003;23(3B):2723-2728.
7. Li S, Symonds ALJ, Zhu B, Liu M, Raymond MV, Miao T, et al. Early Growth Response Gene-2 (Egr-2) Regulates the Development of B and T cells. *PLoS One* 2011;6(4):e18498.
8. Passiatore G, Gentilella A, Rom S, Pacifici M, Bergonzini V, Peruzzi F. Induction of Id-1 by FGF-2 involves activity of EGR-1 and sensitizes neuroblastoma cells to cell death. *J Cell Physiol* 2011;226(7):1763-1770.
9. Xie B, Wang C, Zheng Z, Song B, Ma C, Thiel G, et al. Egr-1 Transactivates Bim Gene Expression to Promote Neuronal Apoptosis. *J Neurosci* 2011;31(13):5032-5044.
10. Gubina E, Luo X, Kwon E, Sakamoto K, Shi YF, Mufson RA. β Cytokine Receptor-Induced Stimulation of cAMP Response Element Binding Protein Phosphorylation Requires Protein Kinase C In Myeloid Cells: A Novel Cytokine Signal Transduction Cascade. *J Immunol* 2001;167(8):4303-4310.
11. Schwachtgen JL, Campbell CJ, Braddock M. Full Promoter Sequence of Human Early Growth Response Factor-1 (Egr-1): Demonstration of a Fifth Functional Serum Response Element. *DNA Seq* 2000;10(6):429-432.
12. Zhang W, Chen S. EGR-1, a UV-inducible gene in p53-/- Mouse Cells. *Exp Cell Res* 2001;266(1):21-30.
13. Datta R, Rubin E, Sukhatme V, Qureshi S, Hallahan D, Weichselbaum RR, et al. Ionizing radiation activates transcription of the EGR1 gene via CARG elements. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89(21):10149-10153.
14. Buttiglione M, Roca L, Montemurno E, Vitiello F, Capozzi V, Cibelli G. Radiofrequency radiation (900 MHz) induces Egr-1 gene expression and affects cell-cycle control in human neuroblastoma cells. *J Cell Physiol* 2007;213(3):759-767.
15. González-Agüero G, Gutiérrez AA, González-Espinosa D, Solano JD, Morales R, González-Arenas A, et al. Progesterone effects on cell growth of U373 and D54 human astrocytoma cell lines. *Endocrine* 2007;32(2):129-135.
16. Calogero A, Lombardi V, De Gregorio G, Porcellini A, Ucci S, Arcella A, et al. Inhibition of cell growth by EGR-1 in human primary cultures from malignant glioma. *Cancer Cell Int* 2004;4(1):1.
17. Benz AH, Shajari M, Peruzki N, Dehghani F, Maronde E. Early growth response-1 induction by fibroblast growth factor-1 via increase of mitogen-activated protein kinase and inhibition of protein kinase B in hippocampal neurons. *Br J Pharmacol* 2010;160(7):1621-1630.
18. Sakamoto KM, Fraser JK, Lee HJ, Lehman E, Gasson JC. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-3 signaling pathways converge on the CREB-binding site in the human egr-1 promoter. *Mol Cell Biol* 1994;14(9):5975-5985.
19. Kim JH, Jeong IY, Lim Y, Lee YH, Shin SY. Estrogen receptor β stimulates Egr-1 transcription via MEK1/Erk/Elk-1 cascade in C6 glioma cells. *BMB Rep* 2011;44(7):452-457.
20. He TC, Zhou S, da Costa LT, Yu J, Kinzler KW, Vogelstein B. A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95(5):2509-2514.
21. MartínezFrancisco, Ventura-Gallegos JoséLuis, Estrada-Villaseñor Eréndira G, Villegas-Castrejón Hilda, Cruz-Zaragoza Epifanio, Covarrubias-Robles Luis, et al. "Enhanced splenic protection and reduction of parasitaemia following transplantation of splenocytes overexpressing Bcl-2 in a murine malaria model". *Gene Ther Mol Biol* 2008;12(2):331-342.
22. Martínez-Flores F, Jiménez-Orozco FA, Villegas-Castrejón H. Molecular biology of adenoviral vectors. *Cir Cir* 2006;74(6):483-493.
23. Martínez FF, Sakamoto K, Machuca RC, Sandoval L, Villegas CH. "Ad-Egr-1/Luc7 adenoviral vector is functionally activated by UV Light". *Mol Ther* 2011;19(7):1360-1398.
24. Calogero A, Porcellini A, Lombardi V, Fabbiano C, Arcella A, Miscusi M, et al. Sensitivity to cisplatin in primary cell lines derived from human glioma correlates with levels of EGR-1 expression. *Cancer Cell Int* 2011;11:5.
25. Mueller MM, Herold-Mende CC, Riede D, Lange M, Steiner HH, Fusenig NE. Autocrine Growth Regulation by Granulocyte Colony-Stimulating Factor and Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor in Human Gliomas with Tumor Progression. *Am J Pathol* 1999;155(5):1557-1567.
26. Badie B, Goh CS, Klaver J, Herweijer H, Boothman DA. Combined radiation and p53 gene therapy of malignant glioma cells. *Cancer Gene Ther* 1999;6(2):155-162.
27. Liu J, Grogan L, Nau MM, Allegra CJ, Chu E, Wright JJ. Physical interaction between p53 and primary response gene Egr-1. *Int J Oncology* 2001;18(4):863-870.
28. Virolle T, Krones-Herzig A, Baron V, De Gregorio G, Adamson ED, Mercola D. Egr1 Promotes Growth and Survival of Prostate Cancer Cells. Identification of Novel Egr1 Target Genes. *J Biol Chem* 2003;278(14):11802-11810.
29. Mandoki JJ, García-Mondragón MJ, Casa-Tirao B, Jiménez-Orozco FA. Reflections on the Mode of Functioning of Endocrine Systems. *Arch Med Res* 2010;41(8):653-657.
30. Kabat GC, Etgen AM, Rohan TE. Do Steroid Hormones Play a Role in the Etiology of Glioma? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2010;19(10):2421-2427.
31. Ritchie MF, Zhou Y, Soboloff J. WT1/EGR1-mediated Control of STIM1 Expression and Function in Cancer Cells. *Front Biosci* 2011;16:2402-2415.
32. Ernst A, Aigner M, Nakata S, Engel F, Schlotter M, Kloor M, et al. A gene signature distinguishing CD133hi from CD133- colorectal cancer cells: essential role for EGR1 and downstream factors. *Pathology* 2011;43(3):220-227.
33. Mancuso M, Leonardi S, Giardullo P, Pasquali E, Borra F, Stefano ID, et al. The estrogen receptor beta agonist diarylpropionitrile (DPN) inhibits medulloblastoma development via anti-proliferative and pro-apoptotic pathways. *Cancer Lett* 2011;308(2):197-202.
34. Shimoyamada H, Yazawa T, Sato H, Okudela K, Ishii J, Sakaeda M, et al. Early Growth Response-1 Induces and Enhances Vascular Endothelial Growth Factor-A Expression in Lung Cancer Cells. *Cancer Cells. Am J Pathol* 2010;177(1):70-83.