

Regulación de la expresión del gen miostatina en epitelio mamario por glucocorticoides.

Rosa Elvira Nuñez Anita^a, Juan Carlos Santiago Jiménez^b y Marcos Cajero-Juárez^{c*}

^a Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Tarímbaro, Michoacán, México

^b Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Tarímbaro, Michoacán, México

^c Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Km. 9.5 Carretera Morelia-Zinapécuaro. La Palma, cp. 58893. Tarímbaro, Michoacán. México.

*E-mail: cajeromarco@hotmail.com

Recibido 21 agosto 2013, Aceptado 01 octubre 2013

Resumen

La proteína miostatina es el regulador negativo del crecimiento del músculo esquelético; miostatina se expresa además en la glándula mamaria, sin embargo, se conoce poco su papel en este órgano. Los glucocorticoides (GCs) son fármacos utilizados ampliamente en la medicina humana y veterinaria por su capacidad antiinflamatoria e inmunosupresora. Se conoce además que el gen *mstn* posee elementos “cis” de respuesta funcionales para los GCs. En este trabajo analizamos la participación de los GCs en la regulación la expresión del gen *mstn*, en cultivo primario de células de epitelio mamario de bovino (EMB). Los resultados de PCR cuantitativa mostraron un comportamiento bifásico de la expresión del gen *mstn*. Además, la potencia de la expresión del gen *mstn* fue como sigue: a la concentración de 1 nM, Corticosterona > Prednisolona > Hidrocortisona > Dexametasona > Fludrocortisona; a 10 nM, Prednisolona > Hidrocortisona > Corticosterona > Dexametasona; a 100 nM, Hidrocortisona > Corticosterona > Dexametasona. Por el contrario, Betametasona favoreció la disminución de la expresión del gen *mstn* en todas las dosis empleadas. Este trabajo muestra que los GCs modulan la expresión en células EMB del gen *mstn* de forma diferencial.

Palabras clave: Glucocorticoides, miostatina, glándula mamaria, bovino, antiinflamatorio

1. Introducción

La masa muscular representa el equilibrio entre la replicación de células de músculo, la síntesis de proteínas, degradación de proteínas musculares, y la muerte celular [1, 2]. La proteína miostatina (Mstn), anteriormente conocida como factor de diferenciación y crecimiento-8 (GDF-8), Mstn es un miembro de la superfamilia del factor de crecimiento beta, además es un regulador negativo del crecimiento del músculo esquelético y es responsable del correcto desarrollo de la masa muscular [3]. La hipertrofia del músculo esquelético se ha asociado con mutaciones que inactivan al gen *mstn* tanto en ratones como en bovinos [1, 4], generando el fenotipo doble músculo. Los efectos de Mstn sobre la proliferación de músculo esquelético se han estudiado directamente en las células musculares utilizando la proteína recombinante Mstn, los datos sugieren que esta proteína inhibe la masa muscular impidiendo la replicación de las células del músculo y la regulación de la síntesis de proteínas [5].

Manickam [6] demostró que el gen *mstn* se expresa en el tejido adiposo, cardiaco, óseo, y la glándula mamaria. Sin embargo, se sabe poco acerca de la función fisiológica del gen *mstn* en la glándula mamaria. Algunos autores han propuesto que el gen *mstn* puede actuar como un factor autócrino, debido a su capacidad para inducir la actividad transcripcional en las células

mamarias [7]. Otros autores han propuesto que la expresión del gen *mstn* en la glándula mamaria se asocia principalmente con las células epiteliales y muestra una correlación inversa con el estado diferenciado de la glándula. Los más altos niveles del ARN mensajero (ARNm) de *mstn* se correlacionan con períodos de crecimiento ductal máximo, mientras que los más bajos se han detectado durante la gestación. Además, se han detectado niveles muy bajos de ARNm en el inicio de la lactación en el epitelio diferenciado [8].

La glándula mamaria proporciona un excelente sistema para investigar la regulación hormonal de la expresión génica, así como la diferenciación celular [9]. En general, células de la glándula mamaria representan un buen modelo para investigar la regulación de la expresión génica inducida por Glucocorticoides (GCs) sobre el gen *mstn*, debido a los altos niveles de expresión de ARNm en este tejido.

El objetivo de este trabajo fue analizar si distintos GCs son capaces de regular la expresión del gen *mstn*, en este trabajo utilizamos los siguientes compuestos: Betametasona GC (Beta), Corticosterona (Cort), Dexametasona (Dexa), Fludrocortisona (Flud), Hidrocortisona (Hydro), Prednisolona (Pred) y Triamicinolona (Triam). Nuestros resultados mostraron expresión diferencial del gen *mstn* después del

tratamiento con diferentes GCs, además de mostrar una curva de expresión que corresponde a un comportamiento bifásico (El mayor aumento se observó en la dosis más baja).

2. Parte experimental

2.1. Los GCs y los oligonucleótidos se obtuvieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). El medio de cultivo usado fue DMEM/F-12K, además de suero bovino de ternera y penicilina-estreptomicina obtenidos de Invitrogen (Carlsbad, CA). Todos los demás productos químicos utilizados fueron de la más alta calidad y pureza disponible comercialmente, provistos por Sigma-Aldrich.

2.2. Células epiteliales mamarias bovinas (EMB).

Las células EMB fueron aisladas de muestras de tejido de biopsia obtenidas a partir de una glándula mamaria bovina en período de lactancia. Brevemente, el tejido se lavó con solución salina tamponada de fosfatos (PBS) y se sumergió en 70% de etanol durante 20 min. El tejido lobular se diseccionó y se lavó tres veces con PBS. Luego, las células se disgregaron mediante el uso de una solución de digestión (300 U / ml de colagenasa tipo I; 0,05% de colagenasa tipo II; 100 U / ml de DNasa; 1% de penicilina-estreptomicina) durante 90 min a 37 ° C. La suspensión celular se centrifugó, y el sedimento se resuspendió en medio de cultivo DMEM/F-12K suplementado con 10% de suero bovino de ternera y 50 U / ml de penicilina-estreptomicina, 10 mg / ml de insulina, y 1 pM de Dexametasona [10]. El medio libre de Dexametasona se utilizó para los experimentos. Para la propagación, las células EMB se cultivaron en placas de petri de 100 mm (Corning Costar Corp.,

Cambridge, MA), y se mantuvo a 37 ° C en una atmósfera humidificada que contiene 5% de CO₂. El medio se cambió cada dos días hasta lograr la confluencia.

Para determinar la viabilidad temporal de las células EMB, se realizó un conteo directo utilizando un hemocitómetro y en cada paso las células EMB se sembraron en el mismo número inicial en una nueva placa. Por otro lado, para garantizar la naturaleza de los cultivos celulares, se realizó RT-PCR para el gen de prolactina y el gen de κ -caseína.

2.3 PCR en tiempo real (RT-PCR)

Las células EMB se cultivaron a una densidad de 1,5 x 10⁵ células / placa en medio basal durante 24 h, se cambió el medio, y las células fueron tratadas con el vehículo etanol (control), 1, 10, o 100 nM de los diversos GCs durante 96 h. Después de la incubación, el ARN total se extrajo usando el kit comercial para aislamiento de ARN (Roche Applied Science, Indianápolis, IN) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se utilizaron dos microgramos de ARN total el cual fue retro-transcrito utilizando el sistema Superscript II (Invitrogen, Carlsbad, CA). El RT-PCR se realizó usando el sistema de detector de 3000 Roto-Gen Sequence (Corbett Research, Mortlake, NSW, Australia), utilizando SYBR Green como un marcador para la amplificación de ADN. La reacción se realizó con 1 μ l de cDNA y el kit comercial de Supermix-UDG para PCR cuantitativa (Invitrogen), utilizando 30 ciclos de programa de amplificación de tres pasos (94 ° C durante 30 s, 52-58 ° C durante 90 s, 72 ° C durante 90 s) con los oligoprimers específicos de gen, mismos que se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1. Secuencia de oligonucleótidos usados para el análisis de los genes *mstn*, prolactina, κ -caseína, y β -actina, con su respectivo tamaño predicho del amplicon.

Gen	Secuencia de oligonucleótidos (5'-3')	Temperatura de alineación (° C)	Tamaño (bp)
<i>mstn</i>	s-CCCAACTGTGGATATATCTG a-TACCAGTGCCTGGGTTTCATG	55	144
Prolactina	s-TGTGTTTCTTGAAATCATCACC a-AAGTGTCAATCTTGCTTGAATC	57	646
κ -Caseína	s-AGCAAGAGCTGACGGTCACAA a-TGGCAGGCACAGTATTTGACA	58	351
β -Actina	s-AGCAGGAGATGGCCAC a-GGCGTAGAGGTCCCTTG	52	215

La reacción de PCR generó sólo las amplificaciones de ADN específicas esperadas, esto se demostró en cada

caso por el perfil de temperatura de fusión (curva de disociación) y por electroforesis de 5 μ l del producto de

PCR usando un gel de agarosa al 1,5% teñido con bromuro de etidio en tampón Tris-borato-EDTA. No se observaron productos de la PCR en ausencia de ADN (control negativo). La expresión génica se calculó utilizando el ciclo umbral (delta CT), dicho método fue normalizado para el contenido de β -actina, que corresponde a un gen de expresión constitutivo no regulado. Todas las mediciones se realizaron por triplicado.

2.4 Análisis estadístico

Los datos informados son los valores medios de al menos tres experimentos independientes, cada uno implicó tratamientos por triplicado, y se expresan como medias \pm errores estándar de las medias. La significación estadística entre los grupos se determinó mediante un análisis de varianza seguido por la prueba de la t de Student para datos independientes, usando el software GraphPad Prism 5.0 (La Jolla, CA). Las diferencias en los medios con los valores de p de $<0,05$ se consideraron estadísticamente significativos.

3. Resultados y discusión

3.1. Caracterización de las células EMB

Las células EMB se mantuvieron en forma continua en cultivos subconfluentes, su tiempo de replicación celular fue de 24 h, de acuerdo con el conteo de células realizado cada 24 h utilizando un hemocitómetro. La senescencia de los cultivos primarios se caracteriza por la falta de división celular, el aumento de volumen de la célula, y la muerte celular de acuerdo con Jha [11]. Alrededor del pasaje 8, fue evidente una reducción de la proliferación celular (Figura 1A) y un aumento en el volumen celular (datos no presentados), lo que indica la senescencia celular. Por lo tanto, los experimentos se realizaron cuando las células se encontraban en los pasajes celulares 2 a 7. En pasajes iniciales, las células EMB mostraron una organización que asemeja a la estructura del alveolo lactogénico, misma que representa una característica de las células mamarias diferenciadas (Figura 1B). Para la caracterización molecular se determinó expresión de los genes: prolactina, K-caseína, y *mstn*. La línea celular de EMB mostró expresión de genes específicos de tejido, lo que confirma su fenotipo de glándula mamaria (Figura 1C).

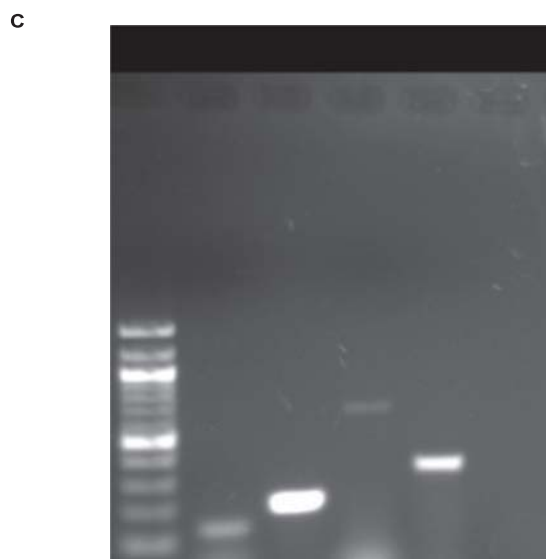
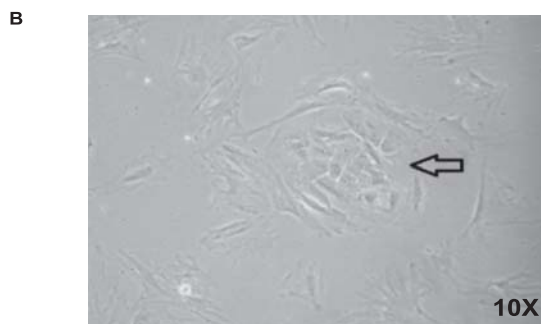
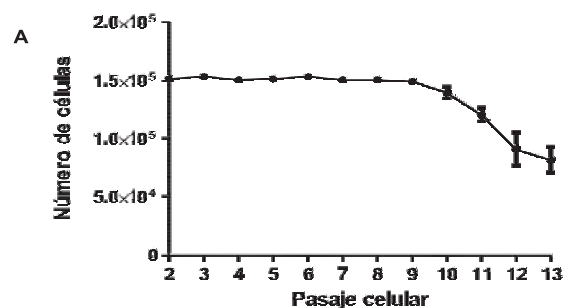


Figura 1. Caracterización de las células EMB. A) Vida útil *in vitro* de las células EMB. Las células se sembraron a una densidad de $1,5 \times 10^5$ por plato de 60 mm, y el número de células por placa se registró en cada pasaje (realizado cada 48 h). B) Morfología de las células EMB (pasaje 4). La flecha muestra la organización de células similar a la luz alveolar, una característica de las células mamarias. C) Productos de RT-PCR utilizando ARN total de las células EMB. Carril M, Marcador de peso molecular 100pb (New England Biolabs); carriles 1, 2, 3, 4, y 5 corresponden a *mstn*, β -actina, prolactina, k-caseína, y el control negativo, respectivamente.

3.2 Regulación de la expresión del ARNm del gen *mstn* por GCs

Las células EMB fueron tratadas con 0, 1, 10, o 100 nM de cada uno de los GC, los niveles de expresión de ARNm para *mstn* se determinaron mediante PCR cuantitativa (oligonucleótidos de la Tabla 1) y se compararon con los niveles presentes en las células de control. Los datos muestran una curva bifásica para la expresión de ARNm de *mstn* en respuesta a la mayoría de los GCs evaluados: a 1 nM, la expresión de ARNm del gen *mstn* se estimuló de la siguiente manera, Cort> Pred> Hydro> Dexa> Flud, mientras que a 10 nM sólo algunos de los GC (Pred> Hydro> Cort> Dexa) indujeron un aumento, a 100 nm, la GC Hydro> Cort>

Dexa indujeron aumento (Figura 2). Estos resultados contrastan con los efectos observados en las células tratadas con Beta, que indujeron una disminución de la expresión de ARNm de *mstn* en todas las dosis, mientras que el tratamiento con Triam sólo provocó una disminución de la expresión de ARNm de *mstn* a 100 nM (Figura 3).

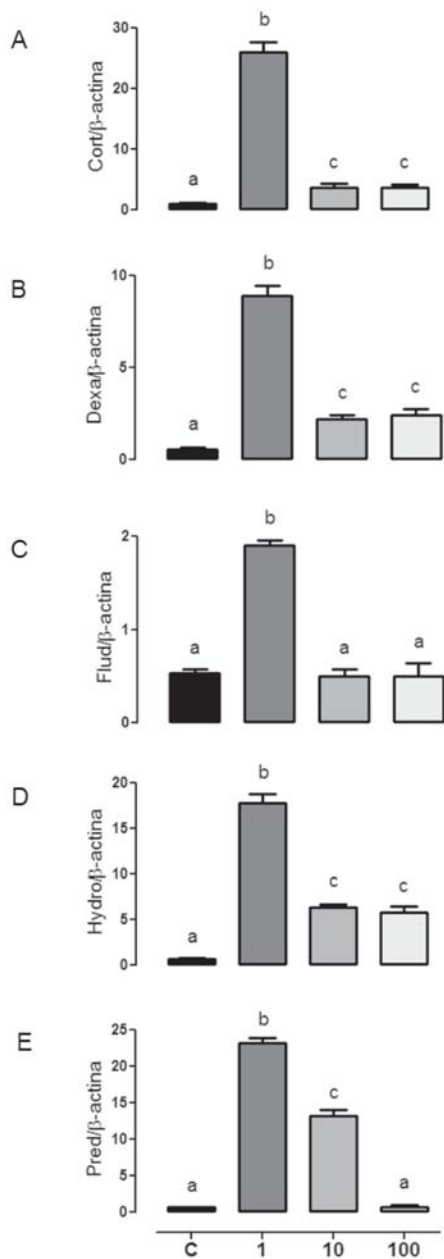


Figura 2. Los aumentos en la expresión *mstn* inducidos por Cort, Dexa, Flud, Hydro y Pred. Las células EMB fueron tratados con vehículo de control (C) ó 1, 10, ó 100 nM de cada uno de los GCs durante 96 h. El ARNm para *mstn* se cuantificó utilizando el método de RT-PCR. El gen de β -actina sirvió como un control interno y se utilizó para normalizar las diferencias de ARN usadas en cada caso. Las diferentes letras minúsculas por encima de las barras indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

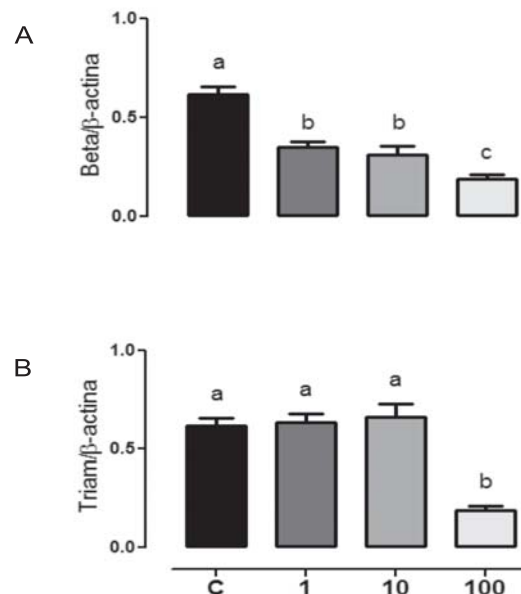


Figura 3. Beta y Triam favorecen la disminución de la expresión de *mstn*. Las células EMB fueron tratadas con vehículo de control (C) ó 1, 10, ó 100 nM de cada uno de los GC después de 96 h de tratamiento. El ARNm para *mstn* se cuantificó mediante RT-PCR. EL gen de β -actina sirvió como un control interno y se utilizó para normalizar las diferencias en el ARN de carga usadas en cada muestra. Las diferentes letras minúsculas por encima de las barras indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Los datos en este estudio mostraron que las células EMB expresan marcadores moleculares específicos de la diferenciación de células epiteliales mamarias. Mostramos además que una baja concentración de los GCs (1 nM) induce una fuerte expresión del gen *mstn*, en comparación con las dosis de 10 nM y 100 nM. Por el contrario, los tratamientos con Beta mostraron disminución de la expresión del gen *mstn* en todas las dosis empleadas, mientras que Triam sólo provocó la disminución de la expresión del gen *mstn* a 100 nM.

Se ha descrito en la literatura que Mstn se traduce como una proteína precursora que se procesa mediante proteólisis para generar un propéptido N-terminal y un dímero C-terminal, que es la forma biológicamente activa. Tras el procesamiento proteolítico, el propéptido permanece unido a la dímero C-terminal lo que mantiene un complejo latente inactivo, y esto representa una de las principales formas de Mstn que circulan en la sangre [12, 13]. Además, otras proteínas de unión son capaces de regular la actividad *mstn in vitro*, incluyendo folistatina, el producto del gen relacionado con folistatina (FRGP), y factor de crecimiento y diferenciación asociada a la proteína de suero-1 (GASP-1) y además se conoce que Mstn puede actuar a través de receptores de ActRIIB [13]. Algunos estudios han mostrado que los mioblastos cultivados expresan una isoforma ActRIIB diferente que la línea celular de

adenocarcinoma de mama humano (MCF-7). Sin embargo, *Mstn* puede transducir señales a través de ambas isoformas, por lo que es poco probable que esta diferencia sea considerada para la especificidad en la señalización de *Mstn*.

Por otro lado, se sabe que los GCs son compuestos anti-inflamatorios e inmunosupresores potentes que se utilizan ampliamente en la medicina humana y veterinaria. Todos los miembros de la familia de los GCs muestran similitudes estructurales, con ligeras diferencias en sus grupos funcionales. Los GCs tienen un efecto regulador directo en el promotor del gen *mstn*, ya que se ha descrito que contiene elementos "cis" de respuesta a GCs funcionales [14]. De hecho, Dexa puede regular tanto el ARNm como a la proteína *Mstn* en las células del músculo esquelético *in vitro* de una manera dependiente de la dosis, lo que indica que Dexa induce un aumento en la expresión del ARNm de *Mstn* por inducción directa de la transcripción [14]. Otros autores han propuesto que la administración de dosis elevadas de GCs induce atrofia muscular, principalmente debido a la estimulación de la proteólisis de las células del músculo [15].

Ma y colaboradores [14] analizaron el efecto sobre la expresión de *mstn* utilizando Dexa en células del músculo esquelético. Ellos observaron un aumento en las concentraciones del ARNm y de la proteína *Mstn*. Se ha sugerido que Dexa podría tener efectos reguladores postraduccionales, es decir, a nivel de la proteína *Mstn*, dichos resultados tendrán que ser analizados más a fondo.

Los GCs son ampliamente utilizados para el tratamiento de varios trastornos inflamatorios, se conoce bien su capacidad para inducir la atrofia muscular en seres humanos y animales. Algunos estudios *in vitro* e *in vivo* han sugerido que los efectos de los GCs en el músculo están mediadas a través de la inhibición de la síntesis de proteínas y un aumento en la degradación de proteínas. Los mecanismos moleculares precisos por los que los GCs inducen los efectos catabólicos se han investigado en las células musculares. Se ha propuesto que los GCs también ejercen una acción anti-anabólica por detener ó frenar de la síntesis de proteínas del músculo. Estos cambios en la expresión o represión de proteínas pueden resultar de cambios en la producción de dos factores de crecimiento que controlan masa muscular, a saber, el factor de crecimiento similar a la insulina I (IGF-I) y *mstn*, que tienen efecto anabólico y catabólico en músculo esquelético respectivamente. Se ha demostrado que tanto la disminución de la producción de IGF-I, así como aumento de la producción de *Mstn* contribuyen a la atrofia muscular causada por GCs. A nivel molecular, el IGF-I antagoniza la acción catabólica de los GCs mediante la inhibición, a través de la vía de 3-

kinase/Akt fosfatidilinositol, la actividad del factor de transcripción FOXO, un interruptor principal para la estimulación de la expresión de varios genes implicados en la atrofia muscular (nombrados algunas veces como atrogenes) [16].

Con respecto a patologías de la glándula mamaria, recientemente se propuso que GCs juegan un papel muy complejo en la epidemiología, la biología y el tratamiento del cáncer de mama [17]. Los GCs juegan un papel esencial en el desarrollo embrionario y la homeostasis del tejido y poseen propiedades anti-inflamatorias e inmunosupresores importantes. Los GCs son un componente importante de los regímenes de tratamiento en enfermedades malignas hematológicas, debido a sus propiedades pro-apoptóticas, y que también se utilizan como co-tratamiento en varios otros tipos de cáncer y en los regímenes de quimioterapia, incluyendo algunos para el tratamiento del cáncer de mama. En el cáncer de mama, sin embargo, los GC pueden tener efectos diversos y pueden inhibir la quimiosensibilidad.

4. Conclusiones

Se obtuvieron cultivos de células EMB alveolar de una glándula mamaria lactante. Las células EMB representan un buen modelo para investigar la expresión génica y la proliferación después del tratamiento hormonal. Nuestros resultados mostraron un comportamiento bifásico en la expresión de gen *mstn* en respuesta a la mayoría de los GCs utilizados. Nuestros resultados sugieren que las diferencias en las estructuras moleculares de los diferentes GCs resultado en efectos diferenciales sobre las células EMB.

Conflicto de intereses.

Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

5. Agradecimientos

Nuñez-Anita agradece al programa de Retención-Repatriación-CONACYT (173382). Santiago-Jiménez fue patrocinado por una beca de CONACYT (188629). Este trabajo fue parcialmente apoyado por becas CIC-UMSNH 2012 y SAGARPA-CONACYT.

6. Referencias

- Grobet, L.; Pirottin, D.; Farnir, F.; et al. *Genesis* **2003**; 35, 227-238.
- Reisz-Porszasz, S.; Bhasin, S.; Artaza, J.N.; et al. *Am J Phys Endocrinol Met* **2003**; 285, E876- E888.
- McPherron, A.C.; Lee, S.J.; et al. *PNAS USA* **1997**; 94, 12457-12461.
- Mcpherron, A.C.; Lawler, A.M.; Lee, S.J.; et al. *Nat* **1997**; 387, 83-90.
- Taylor, W.E.; Bhasin, S.; et al. Artaza, J. *Am J Phys Endocrinol Met* **2001**; 280, E221-E228.



6. Manickam, R.; Pena, R.N.; Whitelaw, C.B.A.; et al. *Mol Rep Dev* **2008**; 75, 1783-1788
7. Ríos, R.; Fernández-Nocelos, S.; Carneiro, I.; et al. *Endocrinol* **2004**; 145, 2795-2803.
8. Su, Z.; Dong, X.; Zhang, B.; et al. *Sci China C, Life Sci* **2006**; 49, 26-36.
9. Levine, J.F.; Stockdale, F.E.; et al. *J Cell Biol* **1985**; 100, 1415-1422.
10. Machuca, M.; Mendoza-Milla, C.; Córdova, E.; et al. *BMC Cell Biology* **2006**; 7, 9.
11. Jha, K.K.; Banga, S.; Palejwala, V.; et al. *Exp Cell Res* **1998**; 245, 1-7.
12. Hill, J.J.; Davies, M.V.; Pearson, A.A.; et al. *J Biol Chem* **2002**; 277, 40735-40741.
13. Lee, S.J.; McPherron, A.C.; et al. *PNAS USA* **2001**; 98, 9306-9311.
14. Ma, K.; Mallidis, C.; Artaza, J.; et al. *Am J Phys Endocrinol Met* **2001**; 281, E1128-E1136.
15. Kanda, F.; Takatani, K.; Okuda, S.; et al. *Muscle Nerve* **1999**; 22, 213-217.
16. Schakman, O.; Gilson, H.; Thissen, J.; et al. *J Endocrinol* **2008**; 197, 1-10.
17. Vaidya, J.S.; Baldassarre, G.; Thorat, M.A.; et al. *Curr Pharm Design*, **2010**; 16, 3593 - 3600.

