



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

**Regulación de la expresión de las isoformas del receptor a progesterona por metilación diferencial de los promotores A y B en el cerebro: su posible participación en conducta reproductiva.**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

Luciano Mendoza Garcés

TUTOR PRINCIPAL

Marco Antonio Cerbón Cervantes, Unidad de Investigación en Reproducción Humana, Instituto Nacional de Perinatología-Facultad de Química, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Alicia González Manjarrez, Instituto de Fisiología Celular, UNAM  
Elizabeth Langley McCarron, Instituto Nacional de Cancerología, SSA

Ciudad Universitaria, Cd. Mx. marzo, 2018



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



## **Agradecimientos**

**A mis padres**

**Al Dr. Marco Antonio Cerbón**



## RESUMEN

En roedores el despliegue de la conducta reproductiva ocurre durante la transición del proestro-estro del ciclo estral. Esta conducta es regulada principalmente por estradiol y progesterona a través de sus receptores intracelulares. Dos isoformas del receptor a progesterona se han descrito (A y B), y son regulados por diferentes promotores. Se ha demostrado que mRNA de ambas isoformas cambia durante la transición proestro-estro. Además, recientemente se ha establecido que la metilación del DNA puede ser transitoria y cíclica en los promotores de los genes, sin embargo, estos cambios solo se han reportado en modelos *in vitro* sin tener reportes sobre modelos fisiológicos. El objetivo de este estudio fue analizar el patrón de metilación del DNA en la región promotora del receptor a progesterona durante la transición proestro-estro en el hipotálamo de la rata y su correlación con la expresión diferencial del mRNA de las isoformas del receptor. Los resultados confirmaron una expresión diferencial de mRNA de las isoformas del receptor a progesterona. La expresión de la isoforma B se incrementa significativamente a las 17:00 h, seguido por una disminución estadísticamente significativa a las 21:00 h del proestro mientras que la expresión total de mensajero del receptor no tiene cambios significativos durante el día del proestro. Es de interés que aunado a lo visto en la expresión, se encontró que el promotor de la isoforma A estuvo desmetilado a nivel del DNA en todos los puntos estudiados de la transición. En contraste el promotor de la isoforma B mostró una metilación transitoria que se incrementa durante la tarde del proestro. En conjunto los resultados indican que hay un cambio en la expresión de las isoformas del receptor a progesterona durante la tarde del proestro que está relacionada con el patrón diferencial de metilación del DNA de las regiones promotoras, presentándose en el promotor de la isoforma B del receptor a progesterona durante la transición del proestro-estro en el hipotálamo de la rata una metilación transitoria del DNA.



# Índice

<b>1. Antecedentes.</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Ciclo estral de la rata.</b>	<b>1</b>
1.1.1. Generalidades.	1
1.1.2. Regulación hormonal durante el ciclo estral.	3
<b>1.2. Conducta reproductiva.</b>	<b>5</b>
<b>1.3. El hipotálamo.</b>	<b>6</b>
1.3.1. Anatomía.	6
1.3.2. Regulación de la conducta reproductiva.	9
<b>1.4. El Receptor a Progesterona.</b>	<b>10</b>
1.4.1. Generalidades.	10
1.4.2. Mecanismo de acción de la progesterona.	12
1.4.3. Isoformas del Receptor a Progesterona.	14
1.4.5. Regulación de la expresión de las isoformas del Receptor a Progesterona en el cerebro.	17
<b>1.5. Metilación del DNA.</b>	<b>19</b>
1.5.1. Generalidades.	19
1.5.2. Metilación de citosinas del gen de Receptor a Progesterona.	21
<b>2. Justificación.</b>	<b>23</b>
<b>3. Hipótesis.</b>	<b>24</b>
<b>4. Objetivos.</b>	<b>25</b>
4.1. General.	25
4.2. Particulares.	25
<b>5. Materiales y métodos.</b>	<b>26</b>
5.1. Animales.	26
5.2. Cuantificación del mRNA por técnica de transcriptasa reversa y PCR en punto final.	27
5.3. Análisis del patrón de metilación por BPS ( <i>Bisulfite Sequencing PCR</i> ).	28
5.4. Análisis del patrón de metilación por enzimas sensibles a metilación.	29
5.5. Radioinmunoensayo.	30
5.6. Análisis estadístico.	30
<b>6. Resultados.</b>	<b>31</b>
<b>7. Discusión.</b>	<b>38</b>
<b>8. Conclusiones.</b>	<b>46</b>
<b>9. Perspectivas.</b>	<b>48</b>
<b>10. Referencias.</b>	<b>51</b>
<b>11. Anexos.</b>	<b>57</b>





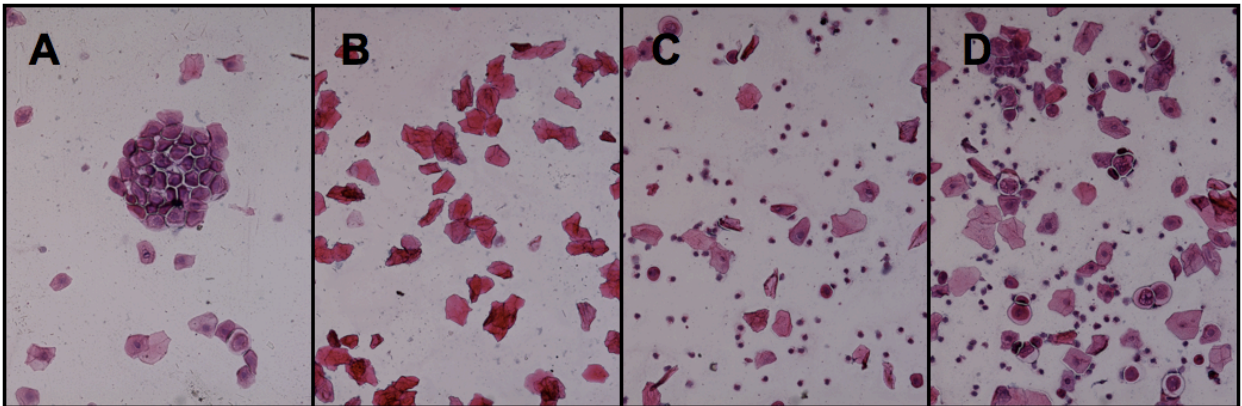
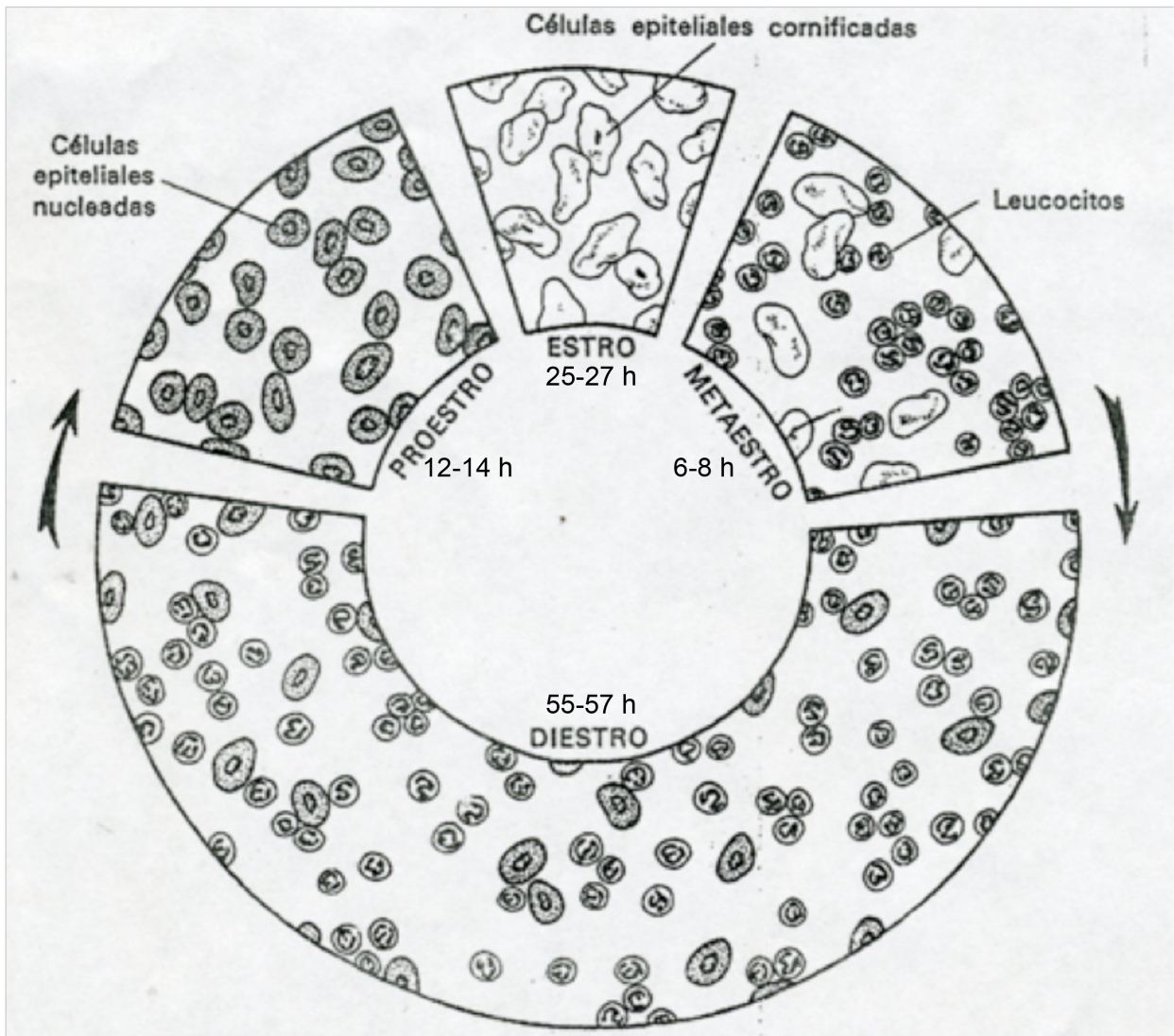
## **1. Antecedentes.**

### **1.1. Ciclo estral de la rata.**

#### **1.1.1. Generalidades.**

La rata de laboratorio es un mamífero no estacional, de ovulación cíclica y poliestro. Este animal tiene una ovulación continua a través de todo el año (caso opuesto a ciclos ovulatorios restringidos a una estación, como por ejemplo en las ovejas). A este tipo de ovulación se le conoce como ciclo estral y se divide en cuatro etapas: el proestro, el estro, el metaestro y el diestro; durante el ciclo se presentan cambios estructurales en tejido reproductivo y variaciones en las concentraciones plasmáticas de hormonas. Mediante frotis vaginal ha sido posible conocer la duración de las diferentes etapas del ciclo estral de la rata, el cual ocurre cada 4 a 5 días ([Mandl 1951](#)).

El proestro tiene un periodo de 12 a 14 h; el estro de 25 a 27 h; el metaestro de 6 a 8 h y el diestro de 55 a 57 h. Los diferentes estadios del ciclo estral pueden ser monitoreados por el tipo de células que aparecen en el frotis vaginal (Figura 1). El proestro está caracterizado por un predominio de células nucleadas epiteliales, que son redondas y aparecen en grupos como “racimos de uvas” a la mitad del proestro; ocasionalmente pueden aparecer unas cuantas células escamosas cornificadas epiteliales (Figura 1A). En el estro, la mayoría de las células son escamosas cornificadas epiteliales, este tipo de células aparecen sin un núcleo visible con un citoplasma altamente granular y presentan una forma irregular (Figura 1B). Durante el metaestro (también llamado diestro 1) y el diestro (también llamado diestro 2) las células que predominan son los leucocitos, en un número significativo, los cuales aparecen como células nucleadas de tamaño pequeño comparado con las células nucleadas epiteliales o las escamosas cornificadas epiteliales. Los leucocitos son pequeños con citoplasma granular y, si se examinan a aumentos mayores, usualmente tienen núcleos vesiculados (Figura 1C y D). La descripción anterior es válida para un ciclo de 4 días, pero si el ciclo fuera de 5 días, sería posible que en el quinto día se observaran células cornificadas (estro) o leucocitos (diestro)([Mandl 1951](#)).



**Figura 1. Etapas del ciclo estral de la rata.** Análisis citológico de frotis obtenidos de la pared vaginal de la rata, las células fueron teñidas con hematoxilina y eosina para determinar los diferentes tipos celulares en cada etapa. **A.** Proestro: células epiteliales nucleadas; **B.** Estro: células epiteliales cornificadas; **C.** Metaestro: células cornificadas y leucocitos; **D.** Diestro: leucocitos con células epiteliales nucleadas. Microscopio de luz a un objetivo 10X (equivale a imagen aumentada 100 veces). En el esquema las horas son duración aproximada de cada etapa.

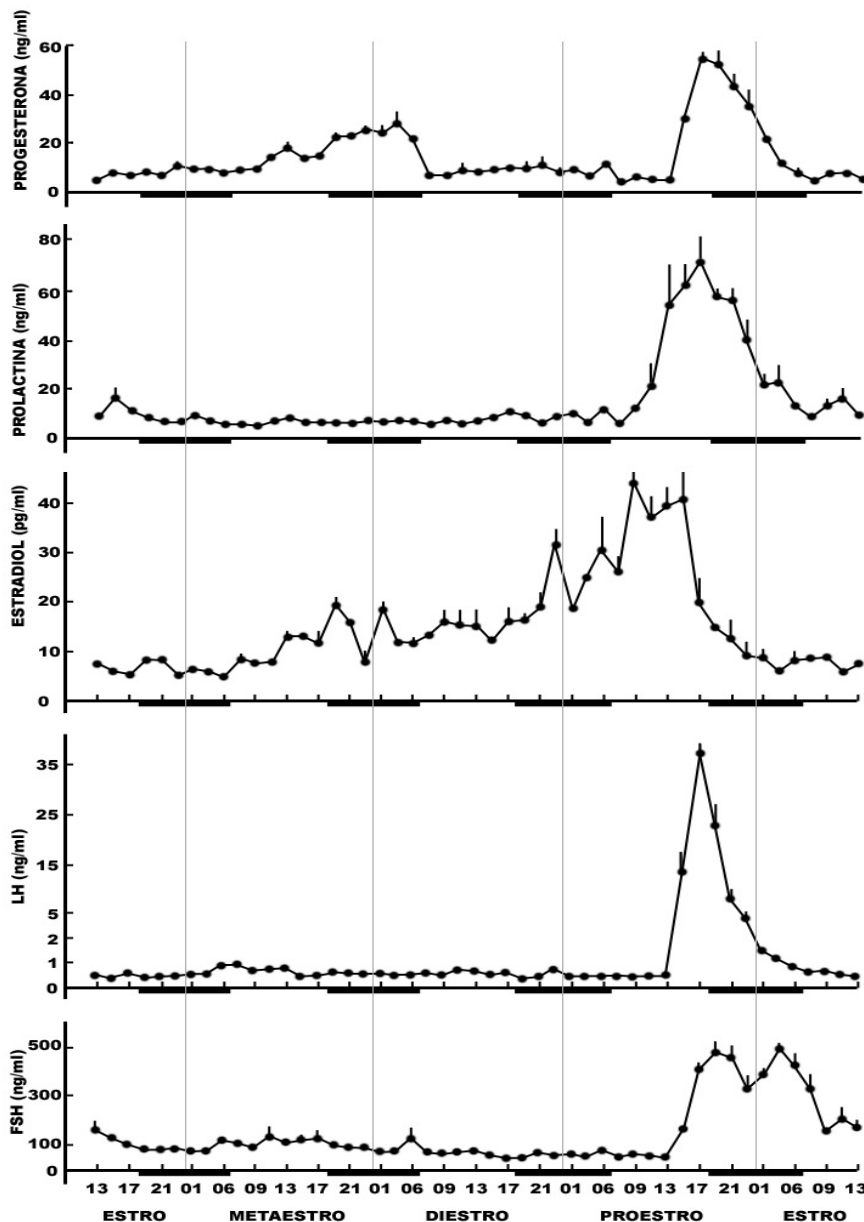
### 1.1.2. Regulación hormonal durante el ciclo estral.

El periodo preovulatorio del ciclo estral está caracterizado por el crecimiento de los folículos ováricos y aumento en la secreción de estrógenos. En ratas con un ciclo estral de cuatro días, el nivel plasmático basal de estradiol ( $E_2$ ) es de  $8 \pm 2$  pg/ml durante la etapa del estro y se incrementa paulatinamente durante el ciclo llegando a un valor máximo de  $45 \pm 2$  pg/ml a las 9:00 del proestro. Durante la tarde del proestro el nivel de  $E_2$  cae rápidamente y alcanza el valor basal en las primeras horas de la mañana del estro. El  $E_2$  es secretado por las células de la teca interna y las células de la granulosa de los folículos De Graaf que se encuentran en desarrollo ([Hashimoto, Henricks et al. 1968](#)).

En la rata adulta, los progestágenos más importantes secretados por los ovarios durante el ciclo estral son la  $20\alpha$ -hidroxipregn-4-en-3-ona, también conocida como  $20$  hidroxiprogesterona ( $20\alpha$ -OH-P) y la progesterona ( $P_4$ ). Se presentan dos fases de secreción máxima para la  $20\alpha$ -OH-P y la  $P_4$  durante el ciclo estral. El primer nivel máximo de ambas hormonas se origina del cuerpo lúteo y ocurre durante la tarde del metaestro. El incremento de la  $P_4$  en el plasma periférico es de  $24 \pm 3$  ng/ml e inicia alrededor del medio día del metaestro, se prolonga hasta la mañana temprana del diestro y cae a nivel basal poco después del comienzo del diestro. El segundo nivel máximo ocurre durante la última parte de la tarde del proestro, donde la  $20\alpha$ -OH-P se sintetiza en el cuerpo lúteo mientras que la  $P_4$  se origina de las células granulosas del folículo preovulatorio y alcanza un valor de  $46 \pm 7$  ng/ml en plasma periférico y regresa al nivel basal de  $2 \pm 1$  ng/ml por la mañana del estro ([Hashimoto and Wiest 1969](#), [Nequin, Alvarez et al. 1979](#)).

El aumento en la concentración de estrógenos en la sangre desencadena un estímulo neural cíclico que activa la liberación de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) por el hipotálamo. La GnRH, a su vez, desencadena la secreción hipofisiaria de la hormona luteinizante (LH). Los niveles circulantes de LH empiezan a incrementarse alrededor de las 14:00 a 15:00 h del proestro y alcanzan su nivel máximo de  $37 \pm 5$  ng/ml entre las 17:00 y 19:00 h de la misma fase (Figura 2). El incremento de LH induce la ruptura folicular y la ovulación, la cual ocurre en las primeras horas del estro. El nivel

plasmático de LH comienza a disminuir en la noche del proestro y alcanza el nivel basal de  $0.5 \pm 0.15$  ng/ml en las primeras horas de la mañana del estro y permanece así durante el resto del ciclo estral. El patrón de secreción de la hormona folículo estimulante (FSH) y prolactina es similar al patrón que sigue LH durante el ciclo estral (Figura 2)(Freeman 2006).



**Figura 2. Concentraciones hormonales durante el ciclo estral de la rata.** Concentración de P<sub>4</sub>, prolactina, E<sub>2</sub>, LH y FSH en plasma periférico obtenido en intervalos de 2 horas a través de los 4 días del ciclo estral de la rata. Las barras negras representan los periodos de obscuridad en la colonia y los números en la base representan la hora del día (Freeman 2006).

## 1.2. Conducta reproductiva.

El ciclo estral tiene la característica de presentar un periodo en el que la conducta de la hembra se hace receptiva al macho y se propicia el apareamiento. Este fenómeno es muy complejo y se ha estudiado de una manera exhaustiva. En forma resumida, durante este periodo en la rata, se observa un cambio de conducta durante la tarde del proestro y el inicio del estro (transición proestro-estro), iniciando alrededor de las 17:00 h del día del proestro y terminando a las 3:00 h del día del estro, en algunos casos, se puede extender hasta las 13:00 h del mismo día del estro. A la conducta de apareamiento se le conoce como conducta reproductiva y se compone básicamente de proceptividad y receptividad (Edwards and Pfeifle 1983).

La conducta de proceptividad tiene como indicadores el “orejeo”, es decir la agitación de las orejas, y la “persecución”, que consiste en carreras que hace la hembra alrededor del macho con repentino paro y salto. Estos son comportamientos de escarceo o insinuación. La conducta de receptividad es una postura física de “facilitación”, conocida como lordosis, que consiste en el arqueamiento de la columna de la rata y el levantamiento de la cola y presentación de la región genital hacia el macho (Erskine 1989).

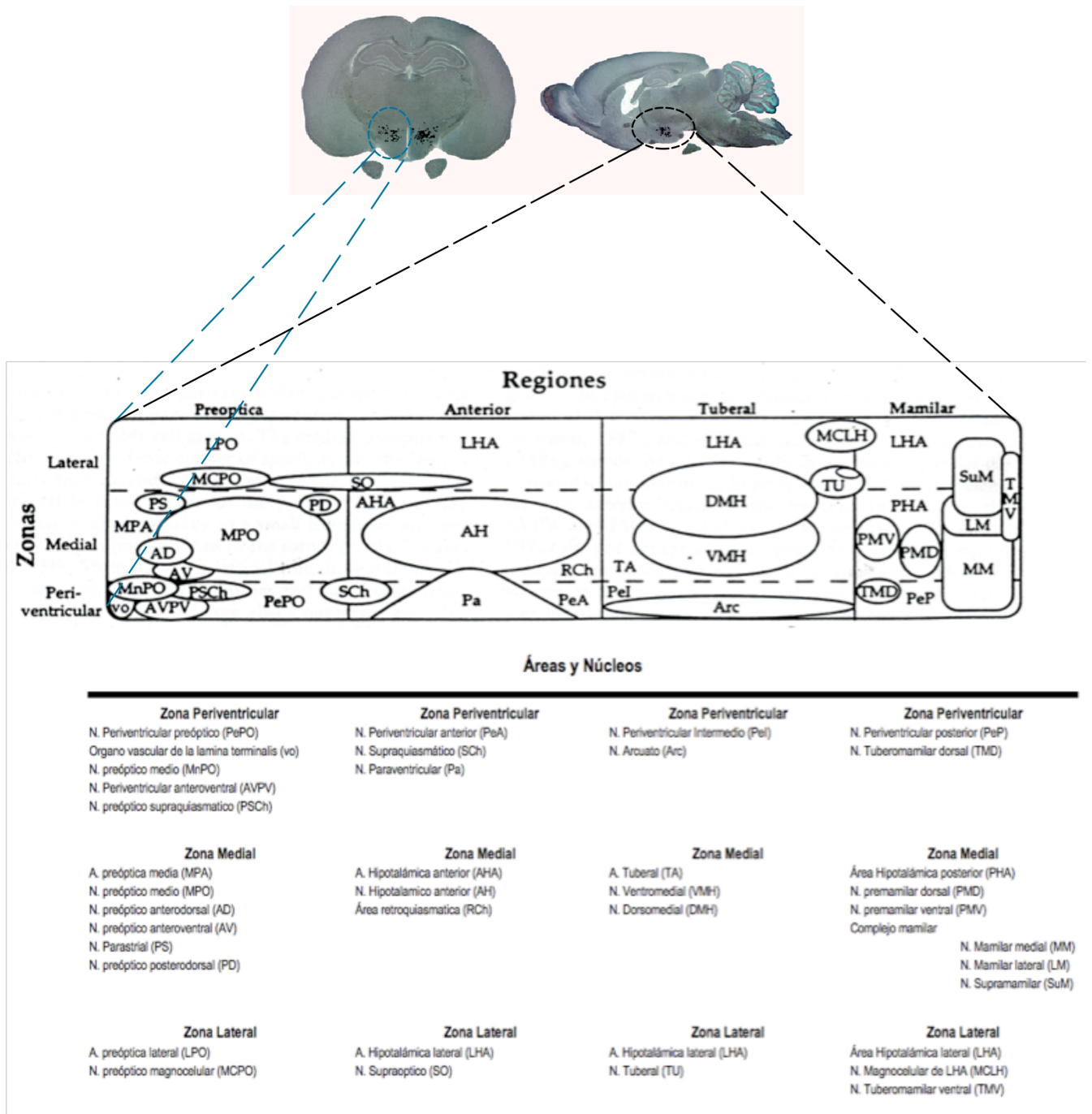
La conducta reproductiva de la rata está relacionada con el aumento en la circulación sanguínea de hormonas esteroides originadas principalmente en los ovarios. Experimentos en ratas ovariectomizadas (OVX) demuestran la desaparición de la conducta reproductiva y su restablecimiento con la administración exógena de  $E_2$  seguida al día uno o dos por administración de  $P_4$ . La simple administración de  $E_2$  a ratas ovariectomizadas puede inducir ciertos aspectos de la conducta reproductiva, tales como la receptividad sexual (lordosis). Sin embargo, la dosis de estradiol seguida de  $P_4$  induce el cuadro completo de conducta sexual que se observa en animales fisiológicamente intactos, es decir la proceptividad y receptividad (Blaustein 2008). Las bases neurales de la conducta sexual son principalmente reguladas por el hipotálamo.

### **1.3. El hipotálamo.**

En mamíferos, se ha demostrado que el hipotálamo es capaz de regular el sistema cardiovascular, respuestas de termorregulación y las vísceras abdominales, además de conductas de agresividad-defensa y conducta de ingesta que involucra nutrientes y agua. Además, el hipotálamo tiene una función esencial en asegurar la conservación de la especie por control de la expresión de la conducta sexual y maternal (Swanson 2011). El hipotálamo representa la vía común final del control neuronal de los lóbulos anterior, intermedio y posterior de la hipófisis. Cabe mencionar que la mayoría de las neuronas que contienen hormonas liberadoras de hormonas se encuentran en la zona periventricular del hipotálamo (Swanson, Sawchenko et al. 1987).

#### **1.3.1. Anatomía.**

El hipotálamo ocupa la mitad ventral del diencefalo a ambos lados del tercer ventrículo y yace inmediatamente arriba de la hipófisis. Dorsalmente, el hipotálamo está unido a lo largo de la mayoría de su longitud por la *zona incerta*, y la orilla media del pedúnculo cerebral corresponde a su frontera lateral. Caudalmente, el hipotálamo se une con la sustancia gris periacueductal y área ventral tegmental del mesencéfalo (Simerly and Swanson 1988). Crosby y Woodburne reconocieron que el hipotálamo es visto mejor como tres distintas zonas longitudinales (figura 3), estas son, región periventricular, media y lateral y su perspectiva es apoyada por análisis fisiológicos y conductuales. La zona periventricular contiene la mayoría de las neuronas que proyectan a la hipófisis y está, por lo tanto, involucrada principalmente en la regulación de la secreción de hormonas de esta glándula. En general, la zona media del hipotálamo consiste en una serie de distintos grupos celulares organizados rostro-caudalmente, que reciben sus principales entradas de varias partes de la región límbica del telencéfalo, tales como el septum y la amígdala (Swanson 1992). Basado en la organización de los grupos celulares de la zona media, Le Gros Clark, en 1938, dividió el hipotálamo en cuatro niveles rostro-caudales, designando las regiones preópticas, supraópticas (también conocida como anterior), tuberal y mamilar (figura 3)(Swanson 1992).



**Figura 3. Organización del hipotálamo.** Representación esquemática de la organización del hipotálamo, mostrando de forma muy simplificada sus zonas, regiones, áreas y núcleos. A. áreas; N. núcleos (Canteras, Simerly et al. 1995).



La zona media del hipotálamo contiene una serie de grandes núcleos que colectivamente juegan un papel clave en el inicio de conductas de motivación tales como conducta copulatoria, agresividad y el apetito. Una notable característica de los núcleos en la zona media es que ellos forman una fuerte conexión bidireccional con la mayoría de las regiones límbicas y tallo cerebral que suministran vías aferentes a la zona medial. Cada una de estas áreas consiste de una especie de materia hipotálmica indiferenciada en la cual muchas condensaciones celulares, o núcleos, están embebidos (Swanson 2011).

El área tuberal del hipotálamo contiene dos grandes núcleos bien diferenciados: El Ventromedial Hipotálmico (VMH) y el Dorsomedial Hipotálmico (DMH). El Ventromedial Hipotálmico es el grupo más grande de células en la región tuberal y está compuesto de dos agrupaciones distintas de células, definiendo las subdivisiones dorsomedial (VMHDM) y ventromedial lateral (VMHVL), las cuales están separadas por una zona escasa de células (VMHC). Una cuarta subdivisión es aparente en niveles anteriores y se designa como la parte anterior (VMHA). El Ventromedial Hipotálmico está rodeado por una cápsula gruesa de fibras o “caparazón” que lo separa de la materia hipotálmica circundante (Millhouse 1973).

Las principales vías aferentes a la región Ventromedial Hipotálmica son de la amígdala y subíctum ventral, con entradas de los núcleos basomedial y posterior de la amígdala y subíctum ventral inervando la parte ventrolateral del caparazón de la región Ventromedial Hipotálmica (Canteras and Swanson 1992). En contraste, los núcleos medial y basolateral de la amígdala proyectan fibras al centro celular del núcleo. La región Ventromedial Hipotálmica también recibe entradas de todas partes de la zona medial del hipotálamo (excepto el núcleo medial y lateral mamilar). Además, la región Ventromedial Hipotálmica recibe entradas de la zona lateral, área hipotálmica anterior y núcleo supraquiasmático (Fahrbach, Morrell et al. 1989).

Las vías aferentes del núcleo parabraquial del tallo cerebral a la región Ventromedial Hipotálmica son las que más atención han recibido debido a la posible relevancia de esta vía metabólica en conducta de inapetencia. La región Ventromedial Hipotálmica envía proyecciones masivas a otras partes de la zona medial del hipotálamo, las proyecciones no son tan comunes en regiones periventriculares y de la zona lateral. La región

Ventromedial Hipotálamica también envía proyecciones a la amígdala y el septum, con la proyección más fuerte al núcleo *striae terminalis*, además de proporcionar proyecciones descendientes a regiones del tallo cerebral, tales como la sustancia gris mesencefálica que son conocidos por proyectar, ya sea a la médula espinal o a los ganglios basales (Canteras, Simerly et al. 1994). Estas proyecciones descendientes son consistentes con el papel propuesto a la región Ventromedial Hipotálamica en la mediación de aspectos somatomotores de la compleja conducta de motivación.

### **1.3.2. Regulación de la conducta reproductiva.**

Las subdivisiones de la región Ventromedial Hipotálamica parecen tener diferentes proyecciones neuronales y algunas de estas extensiones son funcionalmente distintas. Como una gran generalización, la región Ventromedial Hipotálamica Lateral tiene prolongaciones neuronales hacia regiones del cerebro anterior y tallo cerebral que contienen células que expresan receptores a hormonas esteroides sexuales y están involucradas en la mediación de la conducta reproductiva, tales como la amígdala media y el área preóptica media; mientras que la región Ventromedial Hipotálamica Dorsal forma fuertes conexiones con regiones involucradas con la conducta del apetito, tales como los núcleos paraventricular y dorsomedial hipotalámico (Canteras, Simerly et al. 1994).

La asociación que se ha establecido entre la conducta reproductiva y el hipotálamo, concretamente la región Ventromedial Hipotálamica, tiene sus bases en experimentos que involucran la lesión de éste y otros núcleos del hipotálamo. Lesiones electrolíticas en la región Ventromedial Hipotálamica de rata hembra dan como resultado una pérdida de la ovulación y una disminución en la frecuencia de monta en el apareamiento, aunque reportan una recuperación de la conducta de lordosis con el tiempo (La Vaque and Rodgers 1975). El resultado hace ver que no es un solo núcleo cerebral donde se ven concentradas todas las características que componen la conducta reproductiva.

Se ha demostrado que la región Ventromedial Hipotálamica es un núcleo sensible a la  $P_4$ . Al colocar cánulas directas a la región Ventromedial Hipotálamica de ratas hembras ovariectomizadas con tratamiento de  $E_2$ , se ha visto que la administración de  $P_4$  provoca la conducta característica de estro, siendo inefectivos el  $E_2$  y el colesterol (Pleim and

[Barfield 1988](#)). El monitoreo de la actividad neuronal en monos hembras y machos durante el apareamiento ha servido para dilucidar la participación del hipotálamo en la conducta reproductiva, siendo importante para el acto copulatorio la región Ventromedial Hipotálamica en la hembra y la región Dorsomedial Hipotálamica en el macho. El área preóptica media (MPOA) tiene gran relevancia en el despertar del acto sexual ([Oomura, Aou et al. 1988](#)).

El Receptor a Progesterona (RP) y el receptor a estrógenos (RE) se encuentran en neuronas de la región Ventromedial Hipotálamica. Este núcleo proyecta conexiones hacia la sustancia gris mesencefálica, que es un núcleo intermediario hacia neuronas motoras de la lordosis. Estas proyecciones expresan Receptor a Progesterona, además de que se ha encontrado que la expresión de genes tempranos intermediarios, como Fos, se incrementan en la región Ventromedial Hipotálamica durante el apareamiento, lo que indirectamente estaría asociando la actividad de apareamiento con la activación de la región Ventromedial Hipotálamica. Muchas de las neuronas activadas expresan RE. Algunas neuronas de la región Ventromedial Hipotálamica coexpresan Fos y Receptor a Progesterona; algunas de estas neuronas se proyectan a sustancia gris mesencefálica y están en la porción rostral del núcleo ([Flanagan-Cato, Lee et al. 2006](#)). Estos datos indican que las neuronas involucradas en la conducta reproductiva están sensibilizadas a hormonas esteroides sexuales a través de sus receptores específicos.

## **1.4. El Receptor a Progesterona.**

### **1.4.1. Generalidades.**

Las hormonas esteroides influyen en la conducta reproductiva de la rata a través de receptores específicos intracelulares que funcionan como factores de transcripción nucleares ligando-dependientes, regulando la expresión de genes y de redes genómicas ([O'Malley 1990](#)).

En ratones, la pérdida funcional del gen para Receptor a Progesterona causa múltiples anomalías reproductivas, incluyendo pérdida de ovulación, hiperplasia e inflamación

uterinas, desarrollo muy limitado de glándulas mamarias y daño del timo, además de inhibición de la conducta sexual (Lydon, DeMayo et al. 1995).

El Receptor a Progesterona muestra una organización estructural de dominios que corresponde a la de los miembros de la superfamilia de receptores a hormonas esteroides. Esta superfamilia se ha organizado en tres grupos generales basados en la similitud química de sus ligandos: 1) los receptores para hormonas esteroides que son receptores a andrógenos (RA), receptores a mineralocorticoides (RM), RE, receptores a glucocorticoides (RG) y Receptor a Progesterona; 2) los receptores de RXR-heterodiméricos, incluido el receptor a tirosina (RT), receptor a vitamina D (RVD), receptor a ácido retinóico (RAR), receptor ácido 9-cis-retinóico (RXR), y receptor a ecdisona (REc), el cual se encuentra en insectos; y 3) un tercer grupo de receptores llamados huérfanos, debido a que no se conoce su ligando. Este grupo incluye a un número de receptores potencialmente importantes como el receptor activador de proliferación de peroxisomas (RAPP), el factor 1 esteriodogénico (SF-1), el receptor al factor-inducido de crecimiento nervioso (NGFI), y el receptor huérfano ligado al cromosoma X (DAX-1)(Evans 1988).

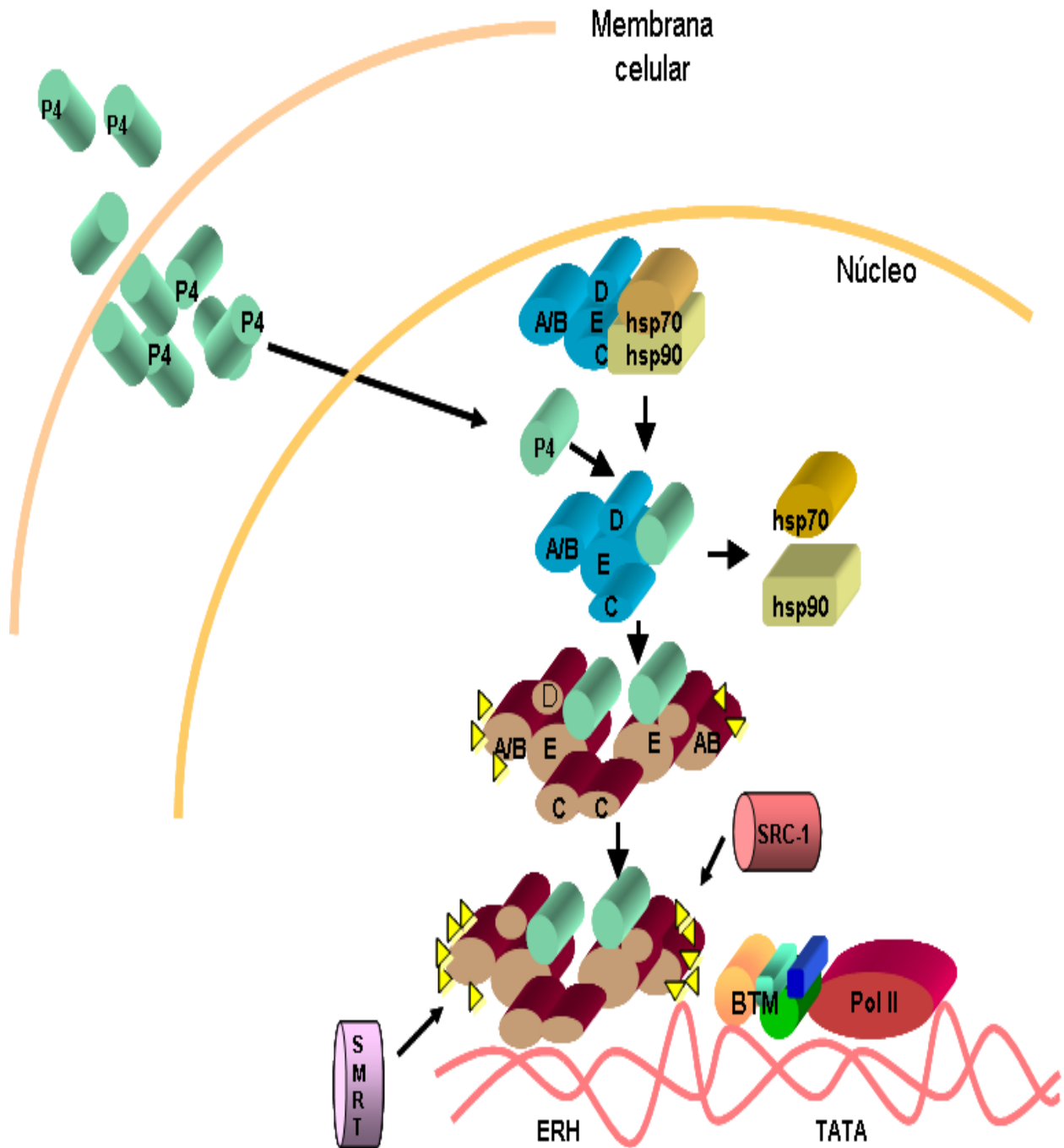
Los miembros de la superfamilia de receptores nucleares a hormonas esteroides muestran tres dominios principales de gran homología (figura 5). En el extremo carboxilo terminal se encuentra el Dominio de Unión al Ligando (LBD, por sus siglas en inglés), el cual comprende de 220 a 250 aminoácidos que contienen dos regiones con identidad de secuencias entre los receptores para sus diferentes hormonas. Le sigue una pequeña región llamada "bisagra" que contiene secuencias de reconocimiento para ciertas proteínas activadoras y/o represoras, este es el llamado dominio de unión a proteínas de choque térmico "*Heat shock*" (HspBD, por sus siglas en inglés) cuya función es la interacción con los receptores para promover su localización nuclear (Jackson, Richer et al. 1997). En contigüidad se encuentra el Dominio de Unión al DNA (DBD, por sus siglas en inglés), formado de unos 65 a 70 aminoácidos y que al igual que el Dominio de Unión al Ligando presenta una alta identidad de secuencia entre los receptores. El Dominio de Unión al DNA parece tener similitudes estructurales a otras proteínas de unión al DNA. La estructura del Dominio de Unión al DNA se compone de dos dedos de zinc, en los cuales cuatro cisteínas coordinan un átomo de zinc. El dominio amino terminal, algunas veces conocido como el dominio inmunogénico, es el menos conservado y varía en longitud de

aproximadamente 600 aminoácidos para el receptor de mineralocorticoides a aproximadamente 25 aminoácidos del receptor de vitamina D (Orti, Bodwell et al. 1992).

#### **1.4.2. Mecanismo de acción de la progesterona.**

El Receptor a Progesterona sufre un cambio conformacional cuando se une a su hormona, permitiendo su translocación nuclear, dimerización y unión al DNA (Beato, Herrlich et al. 1995). La conformación adquirida por el receptor, una vez activado por su ligando, es capaz de reclutar factores generales de transcripción y de esta manera alterar la estructura de la cromatina permitiendo la formación de un complejo de preiniciación y la modulación de expresión de genes blanco (Klein-Hitpass, Tsai et al. 1990).

Las secuencias específicas del DNA a las que se une el complejo receptor-ligando se conocen como elementos de respuesta hormonal (HRE, por sus siglas en inglés). La fosforilación del receptor ocurre después de la activación por su ligando seguido de una serie final de fosforilaciones después de que el receptor se une al DNA previo a la activación del gen blanco (Figura 4). Después de esto, una variedad de cambios fisiológicos pueden originarse; por ejemplo, en respuesta a tratamientos de E<sub>2</sub> y/o P<sub>4</sub> pueden verse alterados sistemas de segundos mensajeros, niveles neurotransmisor/receptor de péptido y liberación de neurotransmisores (Bagchi, Tsai et al. 1992, Takimoto, Tasset et al. 1992).

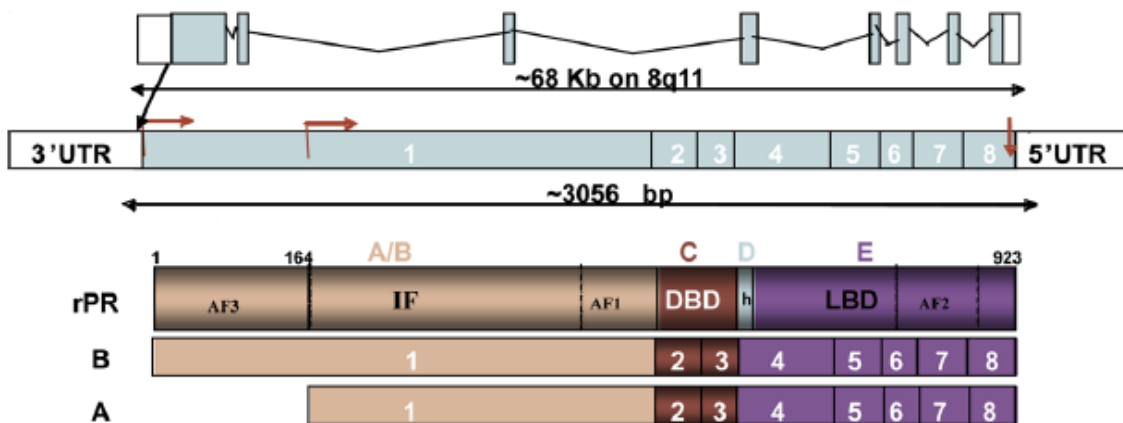


**Figura 4. Regulación de la expresión génica por la P<sub>4</sub> vía RP intracelular.** En la forma sin-ligando el Receptor a Progesterona está asociado con proteínas chaperonas tales como proteínas de choque térmico HSP90 y HSP70. Después la P<sub>4</sub> se une y el Receptor a Progesterona se disocia de las proteínas chaperonas y se dimeriza con otras moléculas de Receptor a Progesterona. Luego el Receptor a Progesterona es fosforilado (triángulos) y se forman complejos con cofactores tales como el coactivador SRC-1 o el correpressor SMRT. El Receptor a Progesterona interactúa con ERH en la región promotora de genes blanco de la P<sub>4</sub>, que también induce la fosforilación del Receptor a Progesterona; y la formación del complejo de transcripción basal (BTM) es reclutada. A/B, C, D y E son dominios del Receptor a Progesterona ([Camacho-Arroyo, Gonzalez-Arenas et al. 2007](#)).

### 1.4.3. Isoformas del Receptor a Progesterona.

Dos isoformas principales se conocen del Receptor a Progesterona, estas son, Receptor a Progesterona A (RP-A) y Receptor a Progesterona B (RP-B)(figura 5), que son producidas de un mismo gen por transcripción de dos distintos promotores y por la traducción de dos señales alternativas de codones de inicio AUG (Kastner, Krust et al. 1990).

Las isoformas Receptor a Progesterona-A y Receptor a Progesterona-B difieren sólo en que el Receptor a Progesterona-B contiene una extensión amino terminal adicional de aproximadamente 165 aminoácidos. Esta región contiene una función de transactivación que es específica del Receptor a Progesterona-B y es requerida para genes blanco específicos que pueden ser activados por el Receptor a Progesterona-B pero no por el Receptor a Progesterona-A (Wen, Xu et al. 1994). Cuando en cultivo celular se expresan individualmente el Receptor a Progesterona-A y el Receptor a Progesterona-B, las isoformas muestran diferentes propiedades de transactivación que son específicas al tipo celular y promotor del gen blanco utilizado (Hovland, Powell et al. 1998).



**Figura 5. Estructura genética y dominios funcionales de las isoformas RP-A y RP-B en la rata.** El receptor a progesterona está compuesto de 8 exones, con 3100 pb para la región codificante, 50 pb para la 3'UTR y 30 pb para la 5'UTR. Ambas isoformas son transcritas por el mismo gen, pero usan diferentes codones de inicio de la transcripción (flechas rojas horizontales), estos codones son regulados por promotores propios. El RP tiene dominio de unión al DNA altamente conservado (DBD), un dominio de función de activación 1 (AF1) inmediatamente *upstream* del DBD, una región bisagra *downstream* del DBD, además de un dominio de unión al ligando (LBD) y un dominio AF2 carbono terminal. Un factor de inhibición (IF) está presente *upstream* del AF1. La región amino terminal del RP-B contiene un dominio AF3, el cual actúa en sinergia con AF1 y AF2 (Brinton, Thompson et al. 2008).

Datos biofísicos y bioquímicos indican que el extremo amino terminal tiene una conformación no-globular. Las isoformas del Receptor a Progesterona contienen por lo

menos dos dominios de activación de transcripción (AF, por sus siglas en inglés). Estos son dominios autónomos transferibles que proveen superficie de interacción para coactivadores ([Edwards, Wardell et al. 2002](#)).

Ha sido bien caracterizado el dominio de activación de transcripción 2 (AF-2) localizado en el Dominio de Unión al Ligando. Una familia de coactivadores p160 interactúa con el Receptor a Progesterona en este dominio y media la actividad de AF-2 en una manera dependiente de la hormona. AF-2 es capaz de unir coactivadores p160 como resultado del cambio conformacional inducido por la hormona esteroide en la mayoría de las alfa hélices del Dominio de Unión al Ligando ubicado en el carboxilo terminal. Ésto crea una cesta de unión hidrofóbica específica para coactivadores p160. El AF-2 es una región altamente conservada entre los receptores nucleares y es de resaltar que coactivadores p160 son capaces de interactuar con un amplio número de receptores nucleares. Se cree que los coactivadores p160 sirven como plataforma para reclutar y generar complejos de coactivadores más generales, tales como CBP, pCAF y CARM-1, que poseen una fuerte actividad enzimática de modificación de histonas ([Edwards, Wardell et al. 2002](#)).

La mayoría de antagonistas de hormonas esteroides no son antagonistas puros y pueden exhibir actividad agonista parcial en células y promotores de genes blancos. Los antagonistas de hormonas esteroides son generalmente inhibidores efectivos de AF-2 como resultado de inducir una conformación alterna de la hélice 12 del Dominio de Unión al Ligando, que bloquea la unión de los coactivadores p160 a la cesta ([Molenda-Figueira, Williams et al. 2006](#)).

El Receptor a Progesterona-B funciona como un activador de la transcripción de muchos promotores dependientes de la acción de la P<sub>4</sub> y en una variedad de tipos celulares en los cuales el Receptor a Progesterona-A está inactivo. Bajo estas condiciones, agonistas que se unen al Receptor a Progesterona-A pueden reprimir la actividad transcripcional del Receptor a Progesterona-B y otros receptores a hormonas esteroides incluyendo al RE $\alpha$  ([Giangrande and McDonnell 1999](#)). Cuando se une un antagonista de progestinas al Receptor a Progesterona-B, pero no al Receptor a Progesterona-A, la isoforma B puede ser convertida en un factor de transcripción activo para vías metabólicas de modulación de fosforilación intracelular ([Sartorius, Melville et al. 1994](#)).



El dominio de activación de transcripción 1 (AF-1) puede funcionar independientemente de AF-2 en una manera constitutiva e independiente de ligando, o puede hacer sinergia con AF-2 en una manera dependiente de ligando. Ha sido propuesto que la sinergia funcional puede ser mediada por una asociación intramolecular entre amino y carboxilo terminal facilitada por coactivadores p160. Sin embargo, AF-1 tiene una fuerte actividad independiente de AF-2 y coactivadores p160, sugiriendo que existen diferentes coactivadores para AF-1. Se requiere un AF-1 intacto para la actividad agonista de los compuestos antagonistas del efecto de la P<sub>4</sub>. Además, se desconocen los coactivadores responsables de mediar la potente actividad independiente de AF-1 y la actividad agonista parcial de antagonistas del efecto de la P<sub>4</sub>. Existe otro dominio de activación de la transcripción conocido como AF-3 y está solo presente en la isoforma B del Receptor a Progesterona. Este dominio está en la extensión exclusiva de aproximadamente 164 aminoácidos del extremo amino terminal de la isoforma B ([Edwards, Wardell et al. 2002](#), [Molenda-Figueira, Williams et al. 2006](#)).

En un modelo de ratones con anulación de la expresión de la proteína del Receptor a Progesterona-A se observó una deficiencia en la implantación del ovocito y se asoció con la pérdida de expresión de una serie de genes relacionados con la receptividad que son regulados por la P<sub>4</sub>. Además, en este mismo modelo se observó que la actividad de proliferación de epitelio uterino regulada por la P<sub>4</sub> es mediada a través del Receptor a Progesterona-B ([Mulac-Jericevic, Mullinax et al. 2000](#)).

Es poco lo que se conoce de las funciones que individualmente ejercen las dos isoformas del Receptor a Progesterona en tejidos blanco de la P<sub>4</sub>. En un sistema *in vitro*, los dos receptores presentan diferencias marcadas en efectos transcripcionales sobre promotores que responden a la P<sub>4</sub> ([Sartorius, Melville et al. 1994](#)). *In vivo*, las dos isoformas del Receptor a Progesterona son usualmente coexpresadas en células normales, los índices o coeficientes varían en diferentes tejidos, estados fisiológicos y en enfermedades. Por ejemplo, en primates tratados con estrógenos, el hipotálamo expresa un exceso del Receptor a Progesterona-B, pero la hipófisis expresa un exceso del Receptor a Progesterona-A ([Bethea and Widmann 1998](#)). En endometrio humano los niveles y coeficiente del Receptor a Progesterona-A y Receptor a Progesterona-B varían

extensivamente durante el ciclo menstrual, y la sobreexpresión del Receptor a Progesterona-B está asociada con elevada presencia de formas malignas de cáncer endometrial, cervical y ovárico ([Fujimoto, Ichigo et al. 1997](#)).

#### **1.4.5. Regulación de la expresión de las isoformas del Receptor a Progesterona en el cerebro.**

La producción de las dos isoformas del Receptor a Progesterona a partir de un mismo gen es una característica muy conservada en un gran número de vertebrados y los coeficientes o índices de relación de las isoformas varía en tejidos reproductivos como una consecuencia del desarrollo, estatus hormonal y durante la carcinogénesis ([Shyamala, Schneider et al. 1990](#), [Graham, Yeates et al. 1996](#), [Duffy, Wells et al. 1997](#)).

Se han hecho trabajos de investigación observando la expresión de las isoformas del Receptor a Progesterona en diferentes partes del cerebro por diversas técnicas. En modelos de ratas ovariectomizadas se han encontrado diferencias en la regulación de la expresión de las isoformas en distintas regiones del cerebro. En hipotálamo, a nivel de mRNA, se observó que el  $E_2$  incrementaba la expresión de ambas isoformas y que la  $P_4$  disminuía, en cambio, en área preóptica solo la isoforma B presentó este patrón. En hipocampo, la isoforma A incrementó su expresión con  $E_2$  pero la  $P_4$  no tuvo efecto en ninguna de las dos isoformas ([Camacho-Arroyo, Guerra-Araiza et al. 1998](#)).

A nivel de proteína, la expresión de las isoformas del Receptor a Progesterona en el cerebro presenta el mismo patrón que el mRNA en las regiones de hipotálamo, área preóptica e hipocampo en ratas ovariectomizadas. En corteza frontal no se observa modificación de la expresión de la proteína del Receptor a Progesterona por el  $E_2$  y la  $P_4$  ([Guerra-Araiza, Villamar-Cruz et al. 2003](#)).

La expresión de las isoformas del Receptor a Progesterona en el cerebro presenta diferencias durante el desarrollo. En el mesencéfalo de ratones hembras y machos se reportó una mayor expresión de la isoforma B durante el desarrollo embrionario y vida postnatal temprana. Durante estas mismas etapas en hipotálamo, área preóptica y corteza cerebral de rata hembra también se presentó este patrón de expresión. Es interesante que

después de la primera semana postnatal la expresión de la isoforma A es mayor y se mantiene hasta la madurez sexual ([Brinton, Thompson et al. 2008](#)).

En modelos de ratas hembras adultas intactas el patrón de expresión de isoformas del Receptor a Progesterona en diferentes regiones del cerebro a nivel de mRNA cambia durante el ciclo estral. La isoforma B se expresa más que la isoforma A a lo largo del ciclo en hipotálamo, área preóptica y corteza cerebral frontal, mientras que en el hipocampo no existen diferencias significativas entre ambas isoformas. Las expresiones máximas de cada una de las isoformas se presentan en diferentes etapas del ciclo. Para la isoforma B en el hipotálamo, la expresión máxima es en el proestro; en área preóptica en el metaestro y en corteza cerebral frontal en el diestro. En el hipocampo no se observan máximos ([Guerra-Araiza, Cerbon et al. 2000](#), [Guerra-Araiza, Villamar-Cruz et al. 2003](#)).

A nivel de proteína, la expresión de las isoformas presenta diferencias con respecto a lo reportado en mRNA. No existe una isoforma que se exprese más que la otra a lo largo del ciclo estral en hipotálamo, área preóptica, corteza cerebral frontal e hipocampo. En el hipotálamo, la menor cantidad de ambas isoformas se observó en el día del diestro, la expresión de la isoforma A presenta una disminución significativa en esta etapa en comparación con otras etapas del ciclo; en contraste en el área preóptica, el contenido máximo de ambas isoformas fue en el diestro, y el mínimo de contenido se dio en la etapa del estro. No hubo cambios significativos en la cantidad de proteína de ambas isoformas del Receptor a Progesterona en el hipocampo a lo largo del ciclo estral. En la corteza cerebral frontal se presenta la mínima cantidad de la proteína de isoforma B en el estro, sin cambios significativos en el contenido de la isoforma A. Estos datos muestran la compleja regulación en la expresión de las isoformas, existiendo en el ambiente fisiológico muchos factores involucrados para la regulación en comparación de los mostrados en los modelos farmacológicos, esto en ratas ovariectomizadas, donde se observa la regulación que se presenta con la administración de el  $E_2$  y la  $P_4$  ([Guerra-Araiza, Villamar-Cruz et al. 2003](#), [Brinton, Thompson et al. 2008](#)).

## 1.5. Metilación del DNA.

### 1.5.1. Generalidades.

Una de las modificaciones epigenéticas más reconocidas y probablemente más estudiada y que influyen en la expresión genética es la metilación al DNA, la cual consiste en la adición de un grupo metilo al carbono en la posición 5 del anillo pirimidínico de la citosina (5mC). En mamíferos, esta modificación al DNA ocurre principalmente en sitios CpG y en general, en regiones de por lo menos 200 pb con 60% o más de sitios CpG, definidos como islas CpG. Sin embargo, la metilación del DNA también puede ocurrir en sitios CpG aislados en una secuencia. El proceso de metilación del DNA está altamente relacionado con modificaciones de la cromatina, alterando la estructura y función de la cromatina, observándose que siempre están relacionados ambos fenómenos ([Menger, Bettscheider et al. 2010](#)).

El mecanismo de metilación del DNA ha sido descrito en diversos procesos celulares, tales como desarrollo, diferenciación y proliferación. Se ha establecido que la estabilidad genómica y la regulación génica dependen de los mecanismos de metilación del DNA. Uno de los principales procesos de metilación descritos es la inactivación del cromosoma X. Esto es a través de la regulación del gen *XIST*, cuyo transcripto es expresado en el cromosoma X placentario de mamíferos y participa como el principal efector del proceso de inactivación del cromosoma X ([Vazquez-Martinez, Mendoza-Garces et al. 2014](#)).

La metilación del DNA es realizada por el grupo de enzimas llamadas DNA metil transferasas (DNMTs). Se ha reportado que las enzimas DNMT3a y DNMT3b son las responsables de la metilación *de novo* y que la enzima DNMT1 es la responsable de mantener los patrones de metilación después de la replicación del DNA a través de la metilación de una plantilla de DNA hemimetilado ([Goldberg, Allis et al. 2007](#)). Actualmente, la metilación del DNA es reconocido como un proceso altamente dinámico, el cual involucra enzimas específicas regulando el proceso de metilación activa y desmetilación ([Gavin, Chase et al. 2013](#)).

Recientemente se ha descubierto el intermediario 5-hidroximetilcitosina (5hmC), este es una segunda modificación en el DNA de vertebrados que se forma por la adición de un

grupo hidroxilo a la 5-metilcitosina (5mC), esto a través de las enzimas conocidas como TETs (por su nombre en inglés *Ten-Eleven Translocation*). La familia de enzimas TET comprende tres citosinas desoxigenasas, que son TET1 y sus dos desoxigenasas parálogas TET2 y TET3. Estas proteínas son desoxigenasas dependientes de Fe(II)/ $\alpha$ -cetoglutarato de la familia AlkB, los miembros de ésta tienen un dominio catalítico  $\beta$ -hélice de doble trenzado (DSBH). El dominio DSBH de JBP1 y JBP2, miembros de la familia AlkB, oxidan el grupo metil de la 5-metilimidina a 5-hidroximetiluracilo (5hmU). Por homología con JBPs y similitud de estructura de la 5mC y la 5-metilimidina se especula que las TETs convierten por el mismo mecanismo que lo hacen las JBPs la 5mC en 5hmC, pero lo que si se ha comprobado es que las TETs catalizan la conversión de 5mC a 5hmC en modelos *in vitro* e *in vivo* (Kohli and Zhang 2013).

Lo anterior ha sugerido que los cambios dinámicos de los patrones de metilación del DNA en mamíferos ocurren por una remoción de 5mC a través de un mecanismo dependiente de enzima. Investigaciones recientes demuestran mecanismos que involucran la conversión del 5mC a productos desaminados como timina y 5hmU; y productos de oxidación como 5hmC, los cuales pueden ser subsecuentemente suprimidos y reparados por DNA glicosilasas luego de ser activada la vía BER de reparación de DNA. En principio, las DNA glicosilasas, tales como TDG y MBD4, inician la reparación vía BER, esto a través del rompimiento del enlace glicosídico entre la base 5mC y la desoxiribosa. Esta actividad usa un mecanismo de corte de base y genera un sitio abásico apurínico/apirimidinico, el cual puede ser reconocido y procesado por enzimas apurínico/apirimidinico endonucleasas, DNA polimerasas y DNA ligasas. Subsecuentemente, la desoxiribosa es removida y remplazada por una citosina no metilada, la cual restaura la secuencia original del DNA. Mientras que un mecanismo preciso y gen específico de la desmetilación del DNA en sitios CpG no se ha demostrado en mamíferos, existe fuerte evidencia que sugiere que las DNA glicosilasas TDG y MBD4 de mamíferos activan la vía BER de reparación del DNA para remover residuos intermedios de la 5mC que son generados por oxidación, desaminación o de ambas (Meng, Cao et al. 2015). En resumen la desmetilación del DNA activa en sitios CpG es alcanzada por la reversión a citosina a través de un proceso no confirmado de oxidación secuencial y posterior mecanismo de reparación de base por escisión.

Aunque la metilación del DNA ha sido implicada en la inhibición de la expresión génica, su efecto está determinado por el sitio CpG donde se dé la metilación. Acorde a la localización de las metilaciones intragénicas o extragénicas los genes pueden ser ya sea inducidos o reprimidos, lo cual es específico para cada gen. En mamíferos, la desmetilación del DNA está presente en el desarrollo temprano de un organismo, cuando el genoma paternal de una célula cigoto es activamente desmetilada antes de la primera división celular, una vez que el cigoto ha tenido varias divisiones celulares se produce la desmetilación del genoma maternal. Más aún, un apropiado desarrollo requiere de metilación de DNA *de novo* en la masa celular del blastocisto, mientras la diferenciación celular requiere metilación del DNA de un gran número de genes. Disrupción de estos eventos causa muerte del feto, o precipita eventos patológicos, tales como el cáncer, por incontrolable señalización de proliferación celular. Un gran número de estudios concuerdan con la idea de que la metilación del DNA es la parte principal en la regulación génica ([Vazquez-Martinez, Mendoza-Garces et al. 2014](#)).

### **1.5.2. Metilación de citosinas del gen de Receptor a Progesterona.**

Varios estudios indican que el gen de Receptor a Progesterona podría ser metilado diferencialmente, en modelos, tanto fisiológicos como patológicos. Por ejemplo, durante el parto, la expresión génica de Receptor a Progesterona-A se incrementa de manera significativa mientras la expresión génica de Receptor a Progesterona-B es inalterada ([Merlino, Welsh et al. 2007](#)). Esta expresión diferencial correlaciona con una disminución de la metilación del DNA en el promotor de Receptor a Progesterona-A, indicando esto que la metilación del DNA puede representar el principal mecanismo epigenético de la expresión diferencial de las isoformas del Receptor a Progesterona en este proceso fisiológico, en el cual cambios en la proporción relativa de las isoformas induce actividad de miometrio y parto ([Li, Chen et al. 2014](#)).

En contraste a los escasos estudios sobre metilación del gen de Receptor a Progesterona en modelos fisiológicos, están los estudios realizados en condiciones patológicas, tales como el cáncer de mama, desórdenes endometriales y tejido ovárico. Muchos estudios realizados indican que la metilación del promotor del gen de Receptor a Progesterona podría estar asociado con cambios en su expresión en diferentes tumores humanos.

Particularmente, una serie de estudios indican que un incremento en la metilación del gen de Receptor a Progesterona en tumores endometriales estuvo asociado con un decremento de la expresión total del Receptor a Progesterona ([Vazquez-Martinez, Mendoza-Garces et al. 2014](#)).

Existe un limitado consenso sobre los índices de metilación del gen de Receptor a Progesterona encontrados en cáncer de mama comparados con otros tumores, un hecho que puede ser explicado por las diferentes estrategias metodológicas y diseño de estudios clínicos utilizados. Frecuentemente, el número de muestras fue insuficiente y heterogéneo para obtener conclusiones sólidas acerca de la participación de la metilación del gen de Receptor a Progesterona en la enfermedad. Algunos estudios recientes han evaluado el estatus de la metilación de los promotores de Receptor a Progesterona-A y Receptor a Progesterona-B en cáncer de mama ([Gaudet, Campan et al. 2009](#), [Pathiraja, Shetty et al. 2011](#)). Es de interés un estudio que incluye un número significativo de pacientes, que mostró la asociación entre la metilación específica de promotores de Receptor a Progesterona y la respuesta al tratamiento endócrino utilizando anti-estrógenos. Sin embargo, los resultados de este estudio indican que los mecanismos involucrados en la regulación de la expresión del Receptor a Progesterona fueron más que la simple metilación de los promotores. Es relevante que los autores demostraron una correlación específica entre metilación del Receptor a Progesterona-A y resistencia antiestrógenos de cáncer de mama ([Pathiraja, Shetty et al. 2011](#)).

Recientemente ha sido descrito un patrón de metilación diferencial de los promotores de las isoformas del Receptor a Progesterona en pacientes con endometriosis intestinal donde el promotor de Receptor a Progesterona-B estaba significativamente más metilado que el promotor de Receptor a Progesterona-A, como consecuencia la expresión de Receptor a Progesterona-A fue la más predominante en este tejido anormal. Diversos estudios en tejidos tumorales han resaltado la relevancia de la proporción relativa de las isoformas del Receptor a Progesterona en la alteración de la función celular ([Shao 2013](#)).

## 2. Justificación.

La metilación a nivel de DNA se ha descrito como un proceso estable y heredable pero a últimas fechas se sabe que la metilación puede ser un proceso dinámico como se demuestra en un estudio donde observan metilación y desmetilación cíclica, con una periodicidad de alrededor de hora y media, esto en dinucleótidos CpG de promotores de genes que codifican para pS2 (conocido también como TFF1 de sus siglas en inglés Trefoil Factor 1) y receptor a estrógenos  $\alpha$  (RE $\alpha$ ), que además responden a estrógenos, como el E<sub>2</sub>. No se sabe si estos mecanismos participan en la regulación dinámica de las isoformas del Receptor a Progesterona en procesos fisiológicos, como neuroprotección, conducta sexual, conducta materna y múltiples efectos descritos en sistema nervioso central (SNC). Además no existe un análisis del patrón de metilación de las islas CpG de la región 5' al exón 1 del Receptor a Progesterona en hipotálamo de la rata durante el periodo en el que se presenta la conducta sexual donde se ha demostrado un cambio en la expresión de las isoformas del Receptor a Progesterona. Por lo anterior, se pretende estudiar los patrones de metilación del gen del Receptor a Progesterona y la expresión de las isoformas A y B del Receptor a Progesterona. Esto permitirá conocer la participación de la metilación de la región promotora Receptor a Progesterona en la regulación de la transcripción del gen. Se considera que esta pregunta es crítica para entender la compleja regulación de la expresión del Receptor a Progesterona en diversos tejidos, como es el hipotálamo de la rata, y si la metilación podría ser uno de los principales mecanismos de regulación de la expresión de estos receptores.



### **3. Hipótesis.**

La metilación del DNA en islas CpG en regiones promotoras se relaciona con la inhibición de la transcripción en varios modelos fisiopatológicos. Dado que las isoformas del Receptor a Progesterona presentan expresión diferencial del mRNA durante la transición proestro-estro en el hipotálamo de la rata hembra, entonces se espera un patrón de metilación del DNA diferencial de los promotores A y B del Receptor a Progesterona que correlacione con la expresión diferencial del mRNA observada.

## **4. Objetivos.**

### **4.1. General.**

Estudiar la metilación del DNA como mecanismo de regulación de la expresión a nivel transcripcional de las isoformas del Receptor a Progesterona en el hipotálamo de la rata, en un modelo fisiológico (durante la transición poestro-estro) y en uno farmacológico (ratas ovariectomizadas tratadas con E<sub>2</sub> y P<sub>4</sub>).

### **4.2. Particulares.**

Estudiar la expresión de las isoformas del Receptor a Progesterona, a nivel de mRNA, en el hipotálamo de la rata a diferentes horas en la transición del proestro – estro y en ratas ovariectomizadas tratadas con E<sub>2</sub> y P<sub>4</sub>.

Estudiar la influencia de el E<sub>2</sub> y la P<sub>4</sub> en el patrón de metilación de los promotores de las isoformas del Receptor a Progesterona en el hipotálamo de ratas ovariectomizadas y tratadas con E<sub>2</sub> y P<sub>4</sub>.

Analizar el estado de metilación de los promotores del Receptor a Progesterona-A y Receptor a Progesterona-B en el hipotálamo de la rata a diferentes horas en la transición del proestro – estro.

## 5. Materiales y métodos.

### 5.1. Animales.

Se emplearon ratas hembras adultas de la cepa Wistar de aproximadamente 2 meses de edad, se hicieron dos grupos de ratas. Uno de los cuales se les monitoreó su ciclo estral. Las ratas debieron presentar 4 ciclos continuos de 4 días cada uno. Se seleccionaron las ratas en la etapa de proestro-estro y se sacrificaron a las siguientes horas: 9:00, 17:00 y 21:00 h del proestro. El segundo grupo fueron un modelo de ratas farmacológicas, en donde hubo tres tratamientos, el primero fueron ratas ovariectomizadas (OVX), el segundo fueron ratas ovariectomizadas que después de una semana se les administró E<sub>2</sub> por dos días consecutivos (E<sub>2</sub>), y el ultimo fueron ratas ovariectomizadas que a la semana se les administro E<sub>2</sub> por dos días consecutivos y en un tercer día consecutivo se les administro P<sub>4</sub> (E<sub>2</sub>/P<sub>4</sub>). Todas las ratas fueron sacrificadas por decapitación al día siguiente de terminado el tratamiento, se obtuvo el cerebro y se disecó el hipotálamo de acuerdo al atlas de Paxinos y Watson ([Paxinos, Watson et al. 1980](#)). El hipotálamo se definió como un bloque de tejido rostralmente unido por el quiasma óptico y caudalmente por el cuerpo mamar, lateralmente por los surcos hipotálamicos y dorsalmente por un corte de 5mm de profundidad. Conocido comúnmente como el hipotálamo medio basal (MBH) este fragmento incluye el núcleo arcuato, el núcleo periventricular y parte del hipotálamo ventromedial además de eminencia media ([Liu and Arbogast 2009](#)).

La secuencia de nucleotidos del gen de Receptor a Progesterona que se utilizó para el análisis y diseño de los diferentes oligos que se utilizaron en los experimentos se obtuvo del banco de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI), [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov), en la sección de genoma de rata, en el cromosoma 8. Secuencia de referencia NCBI: NC\_005107.4.

## 5.2. Cuantificación del mRNA por técnica de transcriptasa reversa y PCR en punto final.

Se extrajo RNA total usando AllPrep DNA/RNA Mini Kit (QIAGEN®, MD, USA) y fue almacenado a -80°C. La concentración de RNA total se determinó por absorbancia a 260 nm utilizando NanoDrop™ 2000 (Thermo Fisher Scientific, MA, USA), y la integridad se verificó por electroforesis en un gel desnaturante de agarosa al 1% en presencia de formaldehído al 2.2 M. Se convirtió RNA total a cDNA por M-MLV *Reverse Transcriptase* (RT) (Invitrogen®, NY, USA). Se tomó un volumen de la reacción de RT que correspondía aproximadamente a 100 ng de cDNA para hacer PCR de punto final para amplificar isoformas del Receptor a Progesterona y RNA ribosomal 18S, éste utilizado como control de carga. La secuencia de los oligonucleótidos para amplificar el fragmento de Receptor a Progesterona-B (243 pb) fueron 5'-[ACT GAG CTG CAG GCA AAG]-3' en el oligonucleótido sentido y 5'-[CGG ACA GCG ACT GCT GA]-3' en el antisentido. Los oligonucleótidos utilizados para amplificar el fragmento que es común a Receptor a Progesterona-A y Receptor a Progesterona-B (292 pb) fueron 5'-[CTC CTG GAT GAG CCT GAT G]-3' en el sentido y 5'-[CCC GAA TAT AGC TTG ACC TC]-3' en el antisentido. Los oligonucleótidos utilizados para amplificar el fragmento 18S fueron 5'-[AAA CGG CTA CCA CAT CCA AG]-3' en el sentido y 5'-[CCT CCA ATG GAT CCT CGT TA]-3' en el antisentido. Los 25 µl de reacción de PCR tenían: volumen de cDNA previamente sintetizado que correspondían aproximadamente a 100 ng, Tris-HCl (pH 8.3) 20 mM, KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, cada dNTP 0.2 mM, cada oligonucleótido 0.5 µM, y 2.5 unidades de Taq DNA polimerasa. Controles negativos sin cDNA y reacción de RT sin RNA fueron incluidos en los experimentos. Después del paso de desnaturación inicial a 94°C por 5 minutos, la reacción de PCR fue realizada por 25 ciclos, el perfil del ciclo para la amplificación de los genes del Receptor a Progesterona y el 18S fue: 94°C, 30 s; 60°C, 30 s; y 72°C, 1 min. La extensión final del ciclo fue realizada a 72°C por 5 min. Los productos de PCR se separaron en un gel de agarosa al 2% y se hicieron evidentes con bromuro de etidio. La imagen fue capturada por un transiluminador UVP con VisionWorksLS Image Acquisition and Analysis Software 6.7.2 (UVP; CA, USA). La intensidad de las bandas del Receptor a Progesterona o el 18S fueron cuantificadas por densitometría usando software VisionWorksLS (UVP, CA, USA). El nivel de expresión de las isoformas del Receptor a Progesterona fueron normalizados con los del 18S. La expresión relativa de el Receptor a

Progesterona-B y el Receptor a Progesterona-B + Receptor a Progesterona-A se obtuvo dividiendo la intensidad del segmento de amplificación del Receptor a Progesterona-B o el Receptor a Progesterona-B + Receptor a Progesterona-A sobre la señal de intensidad del segmento de amplificación del 18S.

### **5.3. Análisis del patrón de metilación por BPS (*Bisulfite Sequencing PCR*).**

Se extrajo DNA usando AllPrep DNA/RNA Mini Kit (QIAGEN®, MD, USA). El DNA extraído se trató con bisulfito por medio del EZ DNA Methylation™ kit (ZYMO Research Corp. CA, USA), se empleó la técnica de BSP (*Bisulfite sequencing PCR*). Se tomó DNA tratado con bisulfito y se realizó PCR de punto final para amplificar los promotores del Receptor a Progesterona. Para el diseño de los oligos se utilizó el programa Methprimer de la página de Internet *The Li Lab (Laboratory of Molecular Medicine)*, <http://www.urogene.org/index.html>, en su sección de herramientas y bases de datos. Se introdujo la secuencia correspondiente a la región promotora del Receptor a Progesterona y se seleccionaron los pares de oligos que el programa produjo al seleccionar su sección BPS *Bisulfite sequencing PCR*. Las secuencias de los oligonucleótidos para amplificar el promotor del Receptor a Progesterona-B (427 pb) fueron 5'-[TTG AAG TTT TTA TAA AAA TTT TGT TT]-3' en el oligonucleótido sentido y 5'-[AAA CCC TAA AAC TAA AAA ATA ACC C]-3' en el antisentido. Los oligonucleótidos utilizados para amplificar el promotor del Receptor a Progesterona-A (430 pb) fueron 5'-[GGG TAA AAG TTT TTT GAA AAT TTG TT]-3' en el sentido y 5'-[ATA CTA ACT TCC CTA AAA AAA ATC C]-3' en el antisentido. Los 50 µl de reacción de PCR tenían: 2 µl de DNA tratado con bisulfito, 20mM Tris-HCl (pH 8.3), 50mM KCl, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM de cada dNTP, 0.5 µM de cada oligo, y 2.5 unidades de Taq DNA polimerasa. Después del paso de desnaturalización inicial a 95°C por 5 minutos, la reacción de PCR fue realizada por 40 ciclos, el perfil del ciclo para la amplificación de los promotores del Receptor a Progesterona fue: 95°C, 30 s; 59°C, 30 s; y 72°C, 1 min. La extensión final del ciclo fue realizada a 72°C por 5 min. Los productos de PCR se separaron en un gel de agarosa al 1% y se hicieron evidentes con bromuro de etidio. Utilizando el QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN®, MD, USA) se extrajeron las bandas del gel conteniendo los productos del PCR, estos quedaron disueltos en agua, se cuantificaron las muestras con NanoDrop™ 2000 (Thermo Fischer Scientific®, MA, USA). Se hizo clonación de los productos utilizando pGEM®-T Easy Vector System

(Promega Corp.® WI, USA). Se secuenciaron las muestras obtenidas en la unidad de secuenciación y genotipificación (Applied Biosystems, Life Technologies™ Corp. CA, USA) del Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN).

#### **5.4. Análisis del patrón de metilación por enzimas sensibles a metilación.**

El DNA extraído se digirió con endonucleasas, las enzimas de restricción utilizadas fueron *MspI* y *HpaII* (New England Biolabs® Inc., MA, USA), ambas enzimas cortan secuencias CCGG, solo que *HpaII* es sensible a metilación, ya que no corta secuencias C<sup>5-Me</sup>CGG, La digestión se llevo a cabo conforme al inserto proporcionado por la casa comercial. En una reacción de 15 µl se tiene: volumen de DNA conteniendo 200 ng, 1.5 µl de Buffer y 1 µl de enzima. En un termociclador se incubo la reacción a 37°C durante 3 h, después a 70°C durante 20 min. Posteriormente, se tomó 2 µl de la digestión con enzimas para hacer un PCR, se amplificaron fragmentos de los promotores del Receptor a Progesterona conteniendo secuencias CCGG. Para el diseño de los oligos se utilizó el programa Methprimer de la pagina de Internet *The Li Lab (Laboratory of Molecular Medicine)*, <http://www.urogene.org/index.html>, en su sección de herramientas y bases de datos. Se introdujo la secuencia correspondiente a la región promotora del Receptor a Progesterona y se seleccionaron los pares de oligos que el programa produjo al seleccionar su sección MSP *Methylation-Specific* PCR. La secuencia de los oligonucleótidos para amplificar el fragmento del promotor del Receptor a Progesterona-B (344 pb) fueron 5'-[GCG GGC CTT CCT AGA GCG]-3' en el oligonucleótido sentido y 5'-[CCG GTG CTG AAG CAG CCG]-3' en el antisentido. Los oligonucleótidos utilizados para amplificar el fragmento del promotor del Receptor a Progesterona-A (280 pb) fueron 5'-[GGA GAT CCC ACG GGT CCG]-3' en el sentido y 5'-[ACT ACA GAC GAT GCG TCC G]-3' en el antisentido. Los 25 µl de reacción de PCR tenían: 2 µl de DNA digerido con enzima, Tris-HCl (pH 8.3) 20 mM, KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, cada dNTP 0.2 mM, cada oligonucleótido 0.5 µM, y 2.5 unidades de Taq DNA polimerasa. Controles negativos sin DNA y controles de DNA sin digerir con las enzimas fueron incluidos en los experimentos. Después del paso de desnaturalización inicial a 94°C por 5 minutos, la reacción de PCR fue realizada por 30 ciclos, el perfil del ciclo para la amplificación del fragmento del promotor del Receptor a Progesterona fue: 94°C, 30 s; 61°C, 30 s; y 72°C, 1 min. El perfil del ciclo para la amplificación del fragmento del promotor del Receptor a Progesterona-A fue: 94°C, 30 s; 55°C, 30 s; y 72°C, 1 min. La

extensión final del ciclo fue realizada a 72°C por 5 min. Los productos de PCR se separaron en un gel de agarosa al 2% y se hicieron evidentes con bromuro de etidio. Se capturó la imagen digitalmente a través de un transiluminador UVP con VisionWorksLS Image Acquisition and Analysis Software 6.7.2 (UVP; CA, USA).

### **5.5. Radioinmunoensayo.**

Las concentraciones séricas de E<sub>2</sub> y P<sub>4</sub> fueron medidos por radioinmunoensayo. El ensayo fue de doble anticuerpo específico en muestra sérica independiente proveniente de las ratas que se utilizaron en el experimento, las muestras se almacenaron a -70 °C hasta la realización del ensayo. La cuantificación de el E<sub>2</sub> y la P<sub>4</sub> se realizó como previamente se ha reportado (Abraham 1975), se utilizó la técnica de fase sólida <sup>125</sup>I, con el Coat-A-Count Kit (Diagnostic Products Corporation®, CA, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. La sensibilidad del ensayo fue de 5.4 pg/ml para el E<sub>2</sub> y 8.3 ng/ml para la P<sub>4</sub>. Los coeficientes de variación del intra-ensayo e inter-ensayo fueron de 5.3 y 8 % respectivamente para el E<sub>2</sub>; y de 6.5 y 10 % respectivamente para la P<sub>4</sub>.

### **5.6. Análisis estadístico.**

Los valores se expresaron como la media ± la desviación estándar. Para el análisis de la expresión de mRNA y el análisis de las concentraciones de las hormonas en suero las diferencias estadísticas significativas (P<0.05) fueron utilizando ANOVA de una vía y una prueba *post hoc* Tukey's. Los análisis estadísticos se realizaron con el programa Prisma 4 para Macintosh (GraphPad® Software, Inc.).

## 6. Resultados.

El mRNA de el Receptor a Progesterona-B y el Receptor a Progesterona-A son codificados a partir de un mismo gen por lo que comparten la misma secuencia y sólo difieren entre sí por una porción más larga del dominio N-terminal por parte del Receptor a Progesterona-B, por lo anterior es difícil reportar la expresión del mRNA de la isoforma A de forma directa, sólo pudiendo inferir la cantidad de mensajero por variación de la intensidad de la banda correspondiente al mRNA de la isoforma B con respecto a la intensidad de banda representado la cantidad de ambas isoformas. Mediante RT-PCR se amplificaron los mRNA de ambas isoformas, un fragmento correspondiente a Receptor a Progesterona-B de 243 bases y un fragmento común a Receptor a Progesterona-A y Receptor a Progesterona-B correspondiente al dominio de unión a la hormona de 292 pares de bases o llamado en este trabajo como Receptor a Progesterona total.

En ratas sacrificadas a las 9:00, 17:00 y 21:00 h del proestro se pudo inferir que la isoforma A tiene mayor expresión que la B, en todos los puntos observados (Figura 1), esto por la mayor intensidad de la banda correspondiente a ambas isoformas (RP-A+-B) con respecto a la intensidad de la banda correspondiente al mRNA del Receptor a Progesterona-B. La expresión de ambas isoformas (RP-A+-B) no tiene cambios estadísticamente significativos a lo largo de los tres puntos de estudio (Figura 2). Existe un incremento estadísticamente significativo en la expresión de la isoforma B a las 17:00 h del proestro comparado con los puntos 9:00 y 21:00 h de la misma etapa del ciclo estral (Figura 2). A las 17:00 h del proestro los niveles de el  $E_2$  y la  $P_4$  se encuentran altos, mientras que a las 9:00 h del proestro los niveles de el  $E_2$  y la  $P_4$  son bajos. A las 21:00 h del proestro, los niveles de el  $E_2$  son bajos y los de la  $P_4$  permanecen altos con una tendencia a bajar (Tabla 1), estos resultados de concentraciones séricas de las hormonas esteroideas concuerdan con lo reportado en la literatura para la transición proestro-estro del ciclo estral.



## Cambios hormonales durante la transición proestro-estro.

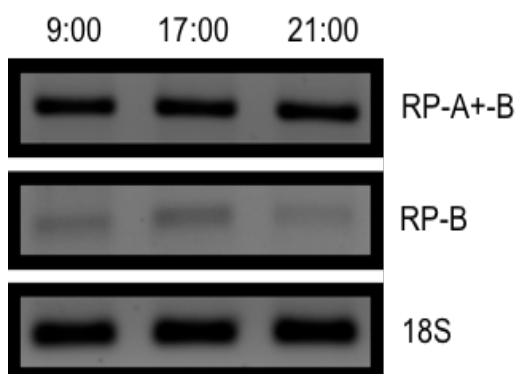
Tabla 1. Concentraciones séricas de E<sub>2</sub> y P<sub>4</sub> en los tres puntos de estudio ratas hembras.

Hora	E <sub>2</sub> (pg/ml)	P <sub>4</sub> (ng/ml)
09:00	34.37 ± 7.17	19.32 ± 4.28
17:00	64.88 ± 5.48 <sup>a</sup>	54.30 ± 11.33 <sup>b</sup>
21:00	24.77 ± 8.24	47.45 ± 8.00

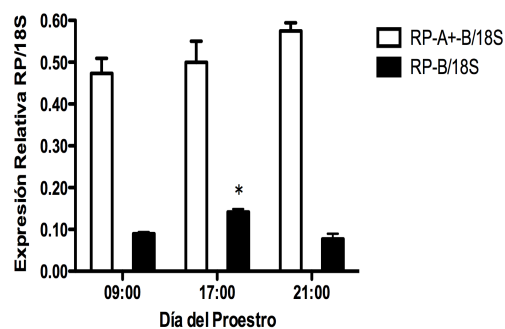
Los resultados están en media ± desviación estándar (n=5), a p<0.05 comparado con 9:00 y 21:00, b p<0.05 comparado con 9:00

Los resultados obtenidos en la expresión diferencial de las isoformas durante la transición proestro-estro sugieren una regulación a nivel de la transcripción y por tanto es justificable explorar el estado de metilación de los promotores de ambas isoformas como posible mecanismo de regulación de la expresión.

### Modificación del mRNA del Receptor a Progesterona (modelo fisiológico)



**Figura 1. Expresión de mRNA de Isoformas del RP en hipotálamo de rata durante el día del proestro.** Imagen de un RT-PCR representativo de ambas isoformas del Receptor a Progesterona (RP-B+A), la isoforma B del Receptor a Progesterona (RP-B) y RNA ribosomal 18S de RNA total de hipotálamo de rata adulta de 4 meses de edad a las 9:00, 17:00 y 21:00 h del proestro.

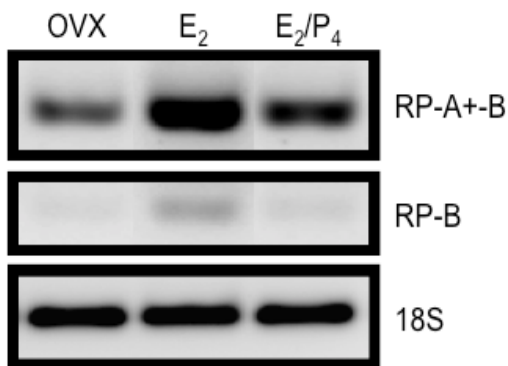


**Figura 2. Análisis densitométrico de la expresión de las isoformas del RP en hipotálamo de rata hembra en el día del proestro.** Los productos de PCR fueron cuantificados por densitometría y corregidos con los valores de 18S. Los resultados son expresados como media ± desviación estándar (n=5) \* p < 0.05 comparada con RP-B a las 9:00 y 21:00 h.

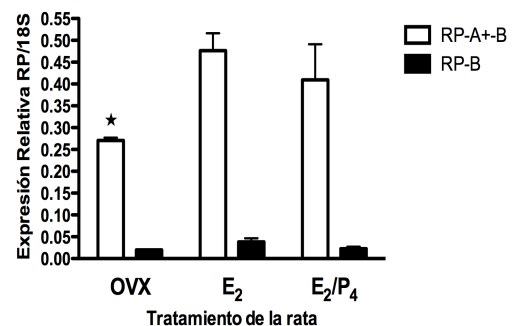
Por otro lado, en el modelo farmacológico, donde se tiene a tres grupos, que son rata ovariectomizada (OVX), rata ovariectomizada y tratada con  $\beta$ -estradiol (E<sub>2</sub>); y rata ovariectomizada tratada con E<sub>2</sub> y posteriormente con progesterona (E<sub>2</sub>/P<sub>4</sub>), se pudo inferir que la isoforma A del Receptor a Progesterona tiene mayor expresión de mRNA que la

isoforma B en los tres grupos (Figura 3), esto debido a la mayor intensidad de la banda correspondiente a la expresión de ambas isoformas (RP-A+-B) con respecto a la banda de la isoforma B (RP-B), la expresión del mRNA del Receptor a Progesterona total inducida con el tratamiento de E<sub>2</sub> se observó como el reportado previamente en la literatura (Camacho-Arroyo, Guerra-Araiza et al. 1998), además hay una tendencia a disminuir la expresión del mensajero de ambas isoformas con el tratamiento E<sub>2</sub>/P<sub>4</sub>, (Figura 4).

### Modificación del mRNA del Receptor a Progesterona (modelo farmacológico)



**Figura 3. Expresión de mRNA de Isoformas del RP en hipotálamo de ratas ovariectomizadas y tratadas con hormonas.** Imagen de un RT-PCR representativo de ambas isoformas del Receptor a Progesterona (RP-A+-B), la isoforma B del Receptor a Progesterona (RP-B) y RNA ribosomal 18S de RNA total de hipotálamo de rata adulta de 4 meses de edad OVX, OVX tratadas con E<sub>2</sub> y OVX tratadas con E<sub>2</sub> y P<sub>4</sub>.

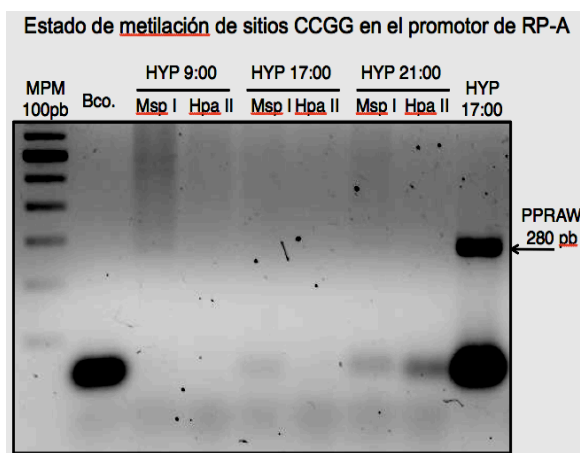


**Figura 4. Densitometría de la expresión de las isoformas del RP en hipotálamo de rata hembra con diferentes tratamientos.** Los productos de PCR fueron cuantificados por densitometría y corregidos con los valores de 18s. Los resultados son expresados como media ± desviación estándar (n=5) \* p < 0.05 comparada con RP-A+-B tratamiento E<sub>2</sub> y E<sub>2</sub>/P<sub>4</sub>.

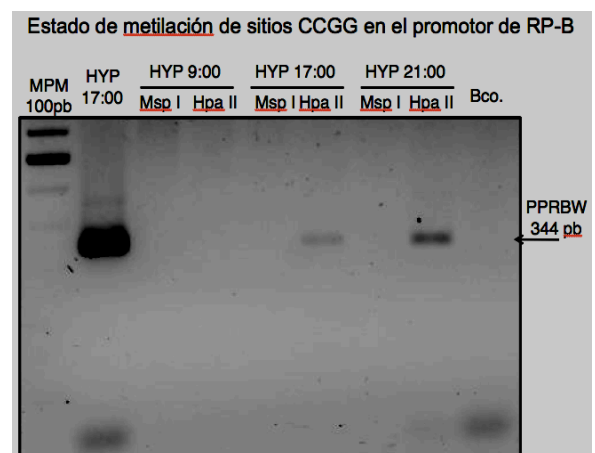
Para analizar el estado de metilación de las secuencias CCGG de los promotores del Receptor a Progesterona se utilizó la enzima de restricción *HpaII* endonucleasa, la cual no corta las secuencias C<sup>5-Me</sup>CGG hemimetiladas o totalmente metiladas, se analizaron los sitios +280, +295 en relación al sitio de inicio de transcripción del promotor del Receptor a Progesterona-B, -125, -81, +93 en relación al sitio de inicio de transcripción del promotor del Receptor a Progesterona-A. Por PCR de punto final se observó que el promotor del Receptor a Progesterona-A, en los puntos de la transición proestro-estro analizadas, no presentó metilación en alguno de los tres sitios CCGG de reconocimiento de corte de las enzimas (Figura 7).

El PCR de punto final que amplificaba el segmento conteniendo los dos sitios CCGG de reconocimiento de corte de las enzimas para el promotor del Receptor a Progesterona-B, mostró una metilación transitoria, ya que a las 9:00 h del proestro no se aprecia metilación de alguno de los dos sitios analizados, pero a las 17:00 y 21:00 h se observan metilados los dos sitios analizados, además se aprecia que la intensidad de la banda a las 17:00 h es más tenue que la de las 21:00 h (Figura 8), lo cual estaría sugiriendo que existe un incremento del proceso de metilación en la transición proestro-estro, estos resultados pueden explicar el comportamiento que se observa en la expresión del mRNA de las isoformas del Receptor a Progesterona, pues al empezar a mostrarse una metilación del promotor del Receptor a Progesterona-B a partir de las 17:00 h del proestro se inhibiría la expresión del mRNA de Receptor a Progesterona-B, mientras que el promotor del Receptor a Progesterona-A al no presentar metilación en los puntos estudiados estaría permitiendo la expresión de mRNA del Receptor a Progesterona-A, correlacionando el estado de metilación de los promotores con la expresión diferencial significativa en las isoformas del Receptor a Progesterona a las 21:00 h.

### Diferencia del patrón de metilación en promotores de las isoformas del RP en hipotálamo de rata en modelo fisiológico mediante análisis de enzimas sensibles a metilación



**Figura 7. Estado de metilación de sitios CCGG en el promotor del RP-A.** El DNA genómico fue digerido con HpaII o con el isoesquisomero MspI insensible a metilación seguido de PCR con oligonucleótidos que contenían y flanqueaban el sitio de reconocimiento de las enzimas.

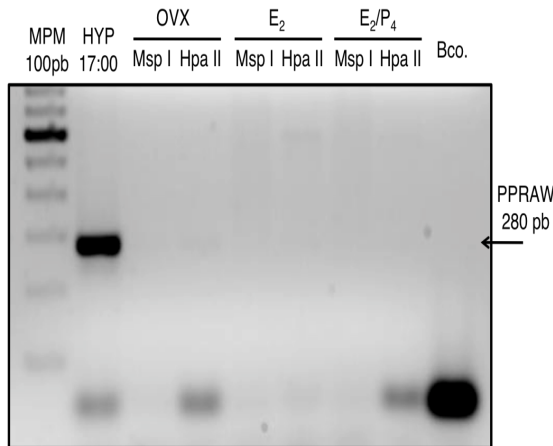


**Figura 8. Estado de metilación de sitios CCGG en el promotor del RP-B.** El DNA genómico fue digerido con HpaII o con el isoesquisomero MspI insensible a metilación seguido de PCR con oligonucleótidos que contenían el sitio de reconocimiento de las enzimas.

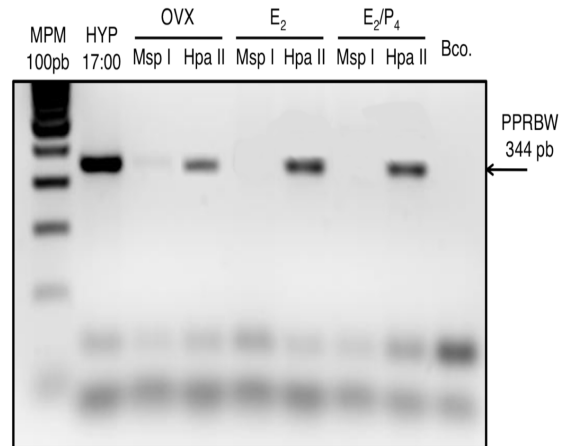
En cuanto a las ratas exógenamente tratadas con hormonas se vio que el promotor del Receptor a Progesterona-A no presentaba metilación en por lo menos alguno de los tres sitios CCGG de reconocimiento de corte de las enzimas en los tres diferentes grupos del modelo farmacológico (Figura 9).

En el amplicón obtenido mediante PCR que amplificaba el segmento conteniendo los dos sitios CCGG de reconocimiento de corte de las enzimas para el promotor del Receptor a Progesterona-B, mostró que los dos sitios analizados se encuentran metilados en los tres grupos (OVX, E<sub>2</sub> y E<sub>2</sub>/P<sub>4</sub>) (Figura 10), lo cual sugiere que las hormonas esteroides en el proceso de metilación, al menos del promotor de la isoforma B del Receptor a Progesterona, no son por si mismas las reguladoras del proceso. Los resultados pueden explicar el patrón diferencial de expresión de mRNA de las isoformas del Receptor a Progesterona observado en el modelo farmacológico de ratas (OVX, E<sub>2</sub> y E<sub>2</sub>/P<sub>4</sub>), esto porque el promotor del Receptor a Progesterona-A al no encontrarse metilado, en los grupos estudiados, correlacionaría con la idea de una expresión activa de mRNA, explicando la mayor expresión del mRNA de la isoforma A del Receptor a Progesterona con respecto a la isoforma B, ésta por el contrario al no encontrarse metilado en su promotor, estaría correlacionando con la idea generalizada de represión transcripcional (Figura 4).

**Diferencia del patrón de metilación en promotores de las isoformas del RP en hipotálamo de rata en modelo farmacológico mediante análisis de enzimas sensibles a metilación**



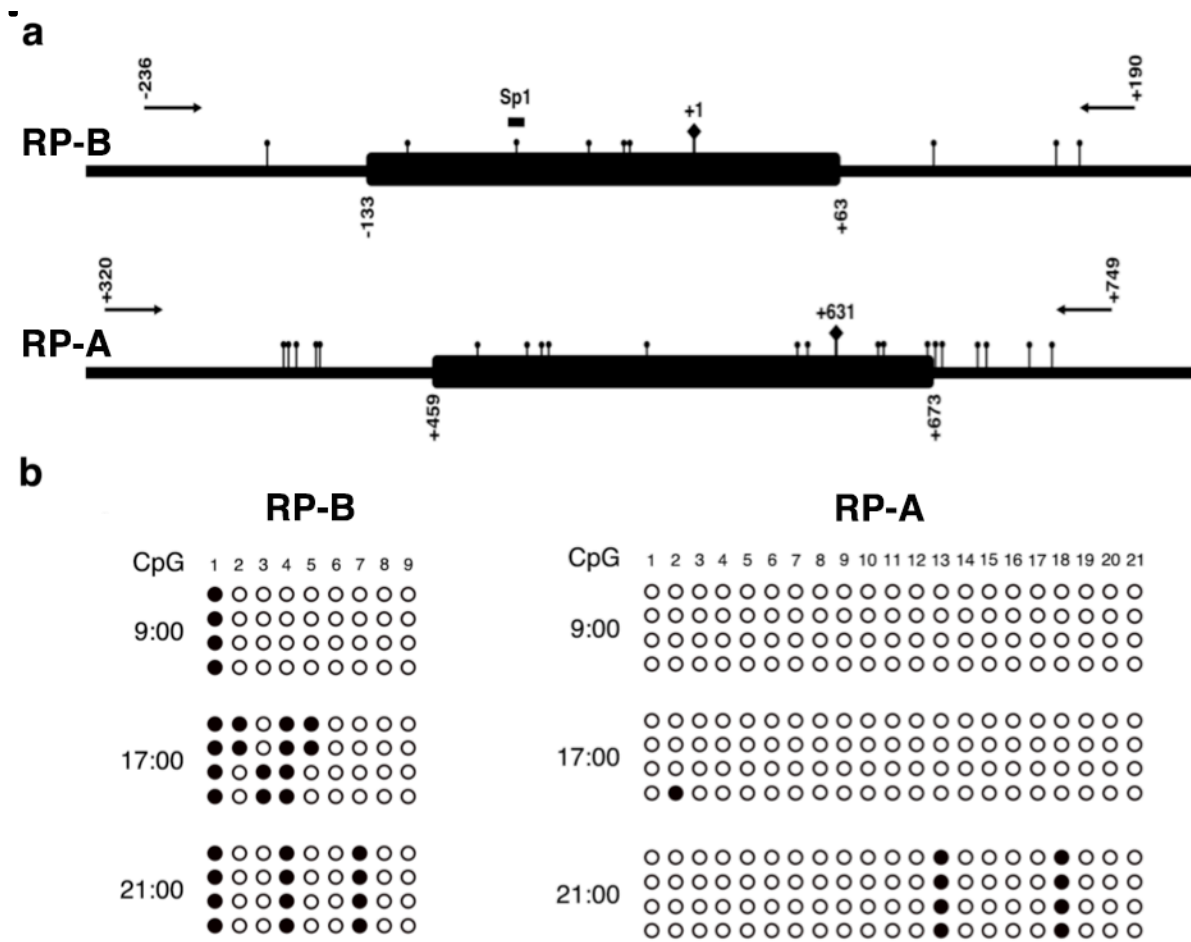
**Figura 9. Estado de metilación de sitios CCGG en el promotor del RP-A (modelo farmacológico).** El DNA genómico fue digerido con HpaII o con el isoesquisomero MspI insensible a metilación seguido de PCR con oligonucleótidos que contenían y flanqueaban el sitio de reconocimiento de las enzimas.



**Figura 10. Estado de metilación de sitios CCGG en el promotor del RP-B (modelo farmacológico).** El DNA genómico fue digerido con HpaII o con el isoesquisomero MspI insensible a metilación seguido de PCR con oligonucleótidos que contenían el sitio de reconocimiento de las enzimas.

Para confirmar el estado de metilación de los promotores de las isoformas del Receptor a Progesterona se empleó la técnica de BSP (*Bisulfite sequencing PCR*). Esta técnica requiere de un primer paso de amplificación y un segundo paso de secuenciación. Los resultados demostraron que el promotor de la isoforma A presentó baja metilación del DNA. Es relevante que algunos sitios CpG en el promotor de la isoforma B presentaron un incremento en la metilación durante el proestro como se aprecia en la figura 11, sugiriendo que existe una metilación transitoria del promotor de la isoforma B.

**Cambios en el patrón de metilación de los promotores de las isoformas del RP en hipotálamo de rata durante el día del proestro**



**Figura 11. Patrones de metilación de los promotores del RP. (a)** Esquema de los promotores de las isoformas del Receptor a Progesterona, las barras gruesas sobre la línea principal representan el tamaño del promotor según lo reportado (Kastner, Krust et al. 1990). +1 y +631 son los sitios de inicio de la transcripción de las isoformas B y A respectivamente; las flechas representan los oligonucleótidos utilizados para la amplificación de fragmentos por la técnica de BSP. Se señala el sitio de unión de Sp1. T son sitios CpG. **(b)** Representación del estado de metilación de los sitios CpG a diferentes horas del proestro, cada fila de círculos representa 5 clonas de un animal, 4 ratas fueron evaluadas en cada hora de estudio; los círculos negros corresponden a sitios CpG metilados; el número arábigo en cada columna de círculos corresponde a sitios CpG contados de izquierda a derecha contenidos en cada región promotora .

## 7. Discusión.

Estudios previos han demostrado la función diferencial que tienen las isoformas del Receptor a Progesterona, esto en modelos animales y cultivos celulares. Se ha demostrado que las isoformas del Receptor a Progesterona interactúan con diferentes coactivadores y correpresores. Además, esta interacción puede ser de manera dependiente o independiente de ligando (Scarpin, Graham et al. 2009). Es de interés que mientras ambas isoformas fueron esenciales para que se observara la conducta sexual facilitada por agonistas de la dopamina (SK 81297) o 8-bromo-cAMP, la isoforma A mostró ser suficiente para la aparición de conducta sexual independiente de ligando, aunque no a los niveles que se observan con ambas isoformas (Mani, Reyna et al. 2006), estos datos demuestran la diferente participación de las isoformas en vías de señalización intramolecular, haciéndonos ver la modulación célula y/o tejido específico de la respuesta a progesterona a través de la expresión diferencial de las isoformas del Receptor a Progesterona. Sin embargo, es todavía escasa la evidencia experimental que soporte la regulación de expresión diferencial del Receptor a Progesterona-A y Receptor a Progesterona-B.

El trabajo hecho provee evidencia de la existencia de metilación a nivel de DNA transitoria en el promotor del gen que codifica para el Receptor a Progesterona-B durante la etapa del proestro en el hipotálamo de la rata. Además, encontramos cambios en la expresión de las isoformas del Receptor a Progesterona durante esta etapa del ciclo estral, en los tres puntos estudiados de la etapa del proestro el mRNA de la isoforma A es más abundante que la isoforma B y estas diferencias son estadísticamente significativas a las 17:00 h del proestro comparado con las 9:00 y 21:00 h. Estos resultados correlacionan con reportes previos que muestran variaciones en el mRNA de las isoformas del Receptor a Progesterona durante la transición del proestro-estro (Liu and Arbogast 2009). Los resultados presentados en este trabajo confirman y abundan en la específica regulación de las isoformas del Receptor a Progesterona a nivel transcripcional durante la transición proestro-estro del ciclo estral de la rata.

Los datos obtenidos en el modelo farmacológico y fisiológico sugieren que el mRNA del Receptor a Progesterona-B es más sensible a variaciones de hormonas esteroides endógenas. Se ha reportado que la expresión del Receptor a Progesterona en el hipotálamo depende de previa inducción de E<sub>2</sub>. El tratamiento con E<sub>2</sub> de ratas ovariectomizadas da por resultado un incremento en la expresión del Receptor a Progesterona, la acción del E<sub>2</sub> sobre la expresión del mRNA del Receptor a Progesterona se dio 24 h post inyección en el núcleo arcuato y ventromedial del hipotálamo de rata. Lo anterior concuerda con lo obtenido en este estudio en los modelos farmacológicos. De hecho, el E<sub>2</sub> incrementa la expresión del gen de el Receptor a Progesterona-B en área preóptica e hipotálamo (Camacho-Arroyo, Guerra-Araiza et al. 1998). Se ha involucrado al receptor a estrógenos alfa (REα) como el mediador en la acción de inducción de expresión del Receptor a Progesterona por estrógenos (Moffatt, Rissman et al. 1998).

En esta investigación se desarrollaron una serie de experimentos para demostrar que existe un patrón específico de metilación de los promotores del Receptor a Progesterona-A y Receptor a Progesterona-B en el hipotálamo de la rata, esto a través del análisis de los patrones de metilación en sitios CpG durante el proestro. Existen 21 sitios CpG en el promotor del Receptor a Progesterona-A, la mayoría de ellos estuvieron desmetilados en los tres puntos estudiados de la etapa del proestro, de hecho solo los sitios +650 y +693 estuvieron metilados a las 21:00 h (Fig. 11). Estos resultados concuerdan con la idea que se tiene de un promotor desmetilado asociado a la expresión del mRNA.

En contraste al promotor del Receptor a Progesterona-A, el promotor del Receptor a Progesterona-B mostró un patrón de metilación diferencial durante la etapa del proestro. La metilación de 9 sitios CpG en el promotor de la isoforma B se incremento en el curso del proestro, como se observa en la figura 11. Estos resultados correlacionan con los cambios observados en la expresión de mRNA del Receptor a Progesterona-B. Por otro lado, se ha reportado la regulación a la alta de ambas isoformas en respuesta a la estimulación con el E<sub>2</sub>, a pesar de que ambos promotores de las isoformas del Receptor a Progesterona no contienen los clásicos Elementos de Respuesta a Estrógenos (ERE). Además, en células HeLa los tratamientos con E<sub>2</sub> inducen e incrementan la actividad del



promotor del Receptor a Progesterona-B cinco veces más a través del RE $\alpha$ , no así con el RE $\beta$  (Flototto, Niederacher et al. 2004). Se ha reportado que los estrógenos regulan a la alta la expresión del gen de RE $\alpha$  en la mayoría de los tejidos de mamíferos (Robertson, Farnell et al. 2002). En el presente estudio la concentración de el E<sub>2</sub> fue más baja a las 9:00 h que a las 17:00 h del proestro. Estos datos correlacionan bien con la baja expresión del Receptor a Progesterona-B en la mañana del proestro (9:00 h). En contraste, cuando los niveles de estradiol se incrementaron durante la tarde del proestro, su expresión se incremento significativamente antes de que se presentara la metilación del promotor (Fig. 1). La subsiguiente disminución de la concentración de estradiol en la tarde del proestro y la metilación del promotor de Receptor a Progesterona-B correlaciona con la disminución de los niveles de mRNA.

Recientemente se ha demostrado que la administración de 5-azacitidina es seguida por un incremento en la expresión de la isoforma B, sin cambios en la expresión del Receptor a Progesterona-A (Hansberg-Pastor, Gonzalez-Arenas et al. 2013). En línea con esto, se tienen reportes de la restauración de la expresión de proteína por la desmetilación de promotores usando agentes desmetilantes en diferentes líneas celulares de cáncer (Zhang, Wang et al. 2011). Varios estudios han demostrado la correlación entre la expresión del Receptor a Progesterona-B y los cambios de metilación de su promotor en diferentes condiciones fisiopatológicas. Específicamente, se ha demostrado que la hipermetilación del Receptor a Progesterona-B esta asociado a cancer de mama, endometriosis, y tumores endometriales, además la hipermetilación del Receptor a Progesterona-B en cultivos celulares *in vitro* es concomitante con la reducción de expresión de Receptor a Progesterona-B (Liu, Zhang et al. 2004, Gaudet, Campan et al. 2009, Lee, Du et al. 2009, Jichan, Xishi et al. 2010).

En adición al párrafo anterior, reportes recientes de análisis genómico indican que los patrones de metilación sobre sitios CpG en las regiones promotoras del Receptor a Progesterona-A y Receptor a Progesterona-B durante el desarrollo se modifican. Acorde a los resultados de este estudio y otros reportes, estos cambios ocurren principalmente en la región promotora de la isoforma B (Mitchell, Sykes et al. 2013), esto nos indica que los

cambios en los patrones de metilación de la región promotora del Receptor a Progesterona puede tener un papel muy importante en el cambio de la expresión de las isoformas en diferentes tipos de células y condiciones fisiopatológicas.

Se ha reportado que el sitio -45 CpG de la región promotora es parte de un secuencia de reconocimiento del factor de transcripción Sp1 (Kraus, Montano et al. 1993). Es interesante que en un ensayo de cambios en la movilidad electroforética para la interacción de Sp1 se demostró que la metilación en el sitio consenso de unión Sp1 no reduce la unión Sp1/Sp3, mientras que la metilación alrededor del sitio consenso de unión induce una disminución significativa en la unión Sp1/Sp3 y por tanto regulación en la expresión génica. Esta observación es similar a lo presentado en este trabajo en un incremento en el proceso de metilación en el sitios CpG cercanos al sitio Sp1 que se encuentra en la región promotora del Receptor a Progesterona-B y correlaciona con el evento de una subsecuente disminución en la expresión del Receptor a Progesterona-B, el cual esta en línea con previos reportes sobre la expresión de las isoformas (Liu and Arbogast 2009). La persistente metilación observada del sitio CpG *upstream* del sitio Sp1 en la región promotora del Receptor a Progesterona parece ser una marca de localización de metilación de Sp1, esto porque durante la fase del proestro un incremento en la metilación en el sitio CpG contiguo se hace aparente y se puede observar en la figura 11. Esta observación sugiere que hay una inactivación de este factor de transcripción como el previamente descrito (Li, He et al. 2004).

Este es el primer reporte evidenciando un patrón de metilación diferencial de la región promotora del gen que codifica para Receptor a Progesterona en un modelo fisiológico. Estos resultados soportan y extienden observaciones previas de patrones de metilación transitoria en regiones promotoras de genes regulados por estrógenos en experimentos que utilizaron líneas celulares (Kangaspeska, Stride et al. 2008).

Debido a que se ha reportado un silenciamiento de genes cuyos promotores presentan metilación, esto por un empaquetamiento del DNA que hace inaccesible la maquinaria de

transcripción ([Issa, Baylin et al. 1996](#), [Ahuja, Li et al. 1998](#)), es importante confirmar esta idea en el modelo de este estudio realizando la técnica de ChIP para confirmar una interacción del RE $\alpha$  en la inducción de los mRNA de las isoformas del Receptor a Progesterona en las horas que no se aprecia metilación del DNA.

Otro aspecto a tomar en cuenta es el grado de metilación de los promotores y la relación con la expresión génica, desafortunadamente las técnicas de análisis de metilación de DNA utilizadas en este estudio no tienen la capacidad de cuantificar la metilación, solo nos permiten ver si existe la metilación en cierto sitio y tiempo, pero no nos dicen que porcentaje de genes presentan esta metilación en la zona de estudio, es decir, que cantidad de tipos de epialelos existen en la muestra seleccionada. La heterogeneidad de la metilación, esto es donde múltiples alelos, los cuales difieren en el patrón de metilación de sitios CpG, están presentes, puede originarse a diversos niveles, el más simple de estos ejemplos es la mezcla de alelos metilados totalmente con no metilados totalmente. El termino epialelos puede ser útil para describir estos múltiples alelos ([Mikeska, Candiloro et al. 2010](#)). Una mezcla homogénea de células puede contener ambos epialelos, como es el caso de los genes improntados H19 ([Kerjean, Dupont et al. 2000](#)). Alternativamente, puede existir la mezcla heterogénea de metilación de epialelos con diferentes grados de metilación, es decir con variedad en la proporción de sitios CpG metilados en la secuencia de interés, como es el caso de este estudio, particularmente lo podemos ver en el punto de las 17:00 hrs del proestro de la figura 11, donde aparentemente existen dos tipos de epialelos en el promotor de la isoforma B pero desafortunadamente no podemos decir en que porcentaje se encuentran.

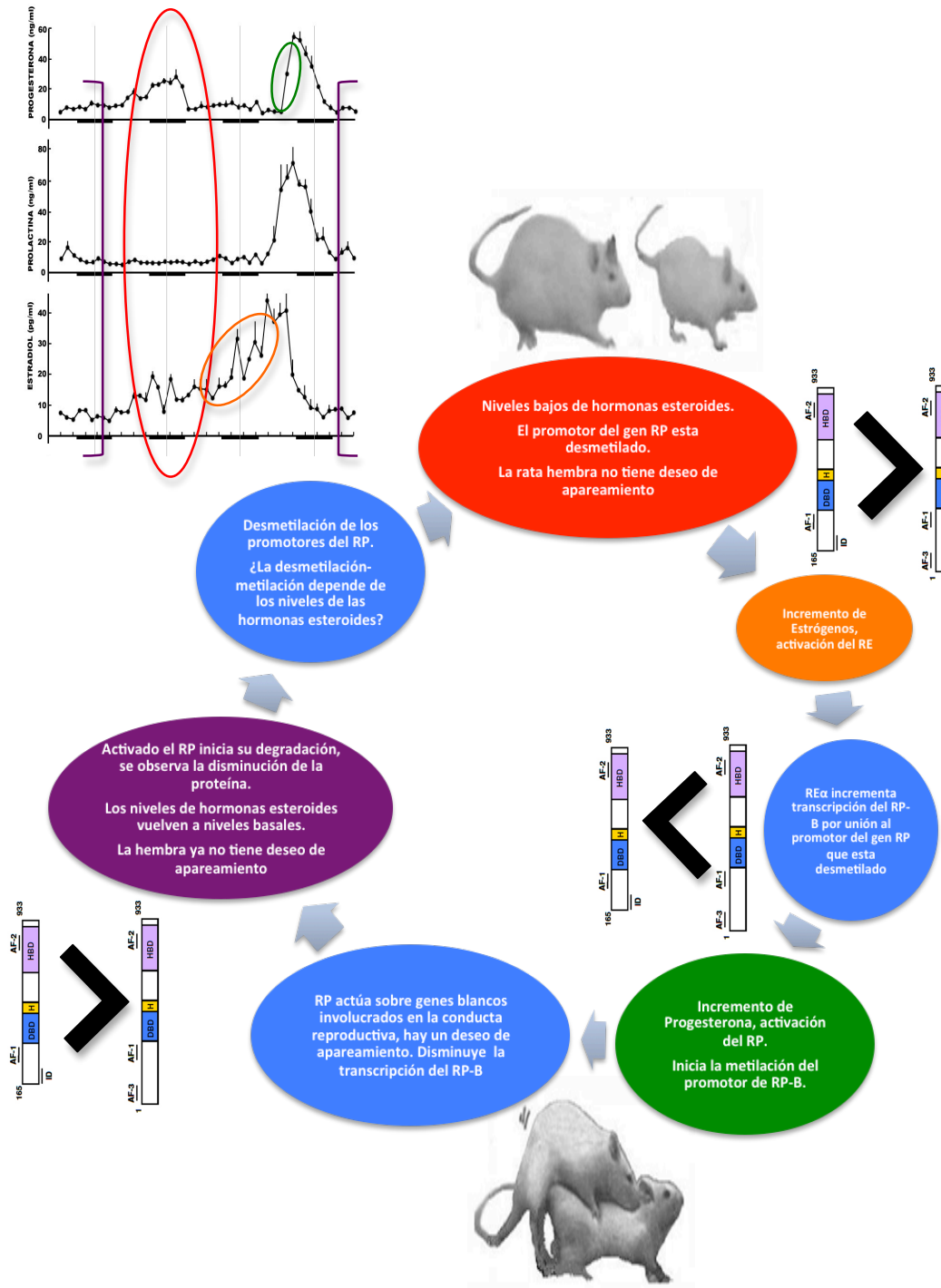
La evidencia de metilación heterogénea es abundante en metilación aberrante de células cancerosas, ejemplos de estos son el gen de reparación de DNA MGMT, el gen de tumor represor RB1, el inhibidor de la progresión del ciclo celular CDKN2B y el gen proapoptotico DAPK1. La heterogeneidad de la metilación del DNA puede resultar de la heterogeneidad de la muestra estudiada como en este estudio donde el hipotálamo esta compuesto por una variedad de tipos celulares, sin embargo, no es claro si esta heterogeneidad deriva de múltiples orígenes independientes de metilación, una

acumulación gradual de cambios en la metilación del DNA durante la replicación semiconservativa de los patrones de metilación del DNA, o si hay un continuo flujo de patrones de metilación del DNA que dañen la progenie mitótica celular ([Mikeska, Candiloro et al. 2010](#)).

Una pregunta que no ha sido resuelta es ¿cuanta metilación de DNA se necesita para reclutar la maquinaria de represión de la transcripción? Para CDKN2B se ha estimado una proporción del 30 al 40 % de los potenciales sitios CpG de metilación. Pero la pregunta queda abierta a que tanto esta cantidad depende del contexto del gen y del promotor que se este estudiando. En este modelo la pregunta anterior tiene relevancia ya que como se ha demostrado, siendo un proceso cíclico (inducible y reversible) de metilación, esta abierta la pregunta de que porcentaje de metilación del DNA en neuronas del hipotálamo activa los procesos de desmetilación para que se mantenga el ciclo de expresión diferenciada durante el ciclo estral, y más aún ¿cuáles son los activadores de este proceso?

La figura 12 muestra una integración de los procesos moleculares con los aspectos de conducta reproductiva que se observan en la hembra durante esta transición proestro-estro. Las principales hormonas esteroides involucradas en la conducta sexual, como los estrógenos y progesterona, presentan concentraciones séricas basales en gran parte de las etapas del ciclo estral, la tarde del estro, todo el diestro y metaestro; y la mañana del proestro, en esta parte del ciclo estral la rata no presenta deseo de apareamiento ([Freeman 2006](#)). Al iniciar la transición proestro-estro los niveles de proteína de la isoforma A predominan sobre los de la isoforma B del Receptor a Progesterona ([Guerra-Araiza, Cerbon et al. 2000](#), [Guerra-Araiza, Villamar-Cruz et al. 2003](#), [Mendoza-Garces, Camacho-Arroyo et al. 2010](#)). Los promotores de las isoformas del Receptor a Progesterona se observan desmetilados. En este inicio de la transición se incrementan paulatinamente las concentraciones séricas del E<sub>2</sub>, los estrógenos incrementan la transcripción del Receptor a Estrógenos, se ha demostrado que el promotor de este receptor contiene Elementos de Respuesta a Estrógenos, secuencias consenso de reconocimiento para el factor de transcripción Receptor a Estrógenos. Se ha observado la

unión de la isoforma  $\alpha$  del Receptor a Estrógenos en la región promotora del gen de Receptor a Progesterona, asociándose esta interacción con el incremento de la transcripción del gen del Receptor a Progesterona (Flototto, Niederacher et al. 2004). Hay un aumento súbito de las concentraciones séricas de progesterona que coinciden con un cambio en la relación del contenido de proteína de las isoformas del Receptor a Progesterona, siendo mayor el contenido de la isoforma B sobre la A, en este punto se observa el incremento de la metilación en el promotor de la isoforma B del Receptor a Progesterona. La activación de la proteína Receptor a Progesterona por su ligando ocasiona la activación de los genes blancos de la progesterona, incluidos los que están involucrados en conducta reproductiva ocasionando que la rata hembra consienta el apareamiento con el macho (Guerra-Araiza and Camacho-Arroyo 2000). La proteína Receptor a Progesterona al interaccionar con su ligando, la  $P_4$ , tiene cambios conformacionales y adquiere marcas químicas como la fosforilación, que le permiten funcionar como un factor de transcripción, pero estas marcas químicas también sirven para identificar a la proteína por el proteosoma, que la degrada y haciendo necesaria la producción de más proteína para seguir teniendo los efectos de la  $P_4$  a través de su receptor (Gonzalez-Flores, Guerra-Araiza et al. 2004). Lo anterior puede aplicar en el cambio que se observa de la relación de contenido de las isoformas del Receptor a Progesterona, donde la isoforma A vuelve a predominar sobre la B, como consecuencia de la metilación diferencial que hemos demostrado en el estudio, donde el promotor del gen de la isoforma B presenta un aumento de la metilación de sitios CpG al avance de la transición proestro-estro, disminuyendo la transcripción de la isoforma B, pero no afectándose la transcripción de la isoforma A, por la desmetilación observada durante la transición del promotor de la isoforma A. En el estudio se observa una disminución de la expresión del mRNA de la isoforma B que se esperaba se traduzca en una relación de proteína donde predomine la isoforma A sobre la B, que aunado a la disminución de las concentraciones séricas de  $E_2$  y  $P_4$ , dan como consecuencia que la hembra no presente un deseo de apareamiento (Mendoza-Garces, Camacho-Arroyo et al. 2010). Algunos aspectos de todo lo anterior son especulaciones de lo que estaría pasando basándose en datos reportados en otros modelos experimentales, estas especulaciones se requieren confirmar en este modelo de estudio.



**Figura 12. Integración de aspectos moleculares con la conducta sexual observada durante la transición proestro-estro de la rata.** RP es isoformas del Receptor a Progesterona. RE es isoformas del Receptor a Estrógenos. RP-B es isoforma B del Receptor a Progesterona. REα es isoforma α del Receptor a Estrógenos. Los colores de fondo en los óvalos con texto están asociados a los colores de los óvalos en la gráfica que muestra las concentraciones de séricas de hormonas esteroides durante el ciclo estral. Las barras de colores esquematizan las proteínas de las isoformas del Receptor a Progesterona, indicando sus Dominios de Unión a Ligando, HBD y sus Dominios a Unión a DNA, DBD.

## 8. Conclusiones.

Los experimentos realizados muestran una expresión transcripcional diferencial entre las isoformas del Receptor a Progesterona en el hipotálamo durante la transición proestro-estro del ciclo estral de la rata. Durante la transición la cantidad de mRNA de la isoforma B alcanza un punto máximo a las 17:00 h del proestro. Estos datos nos hacen evidente la existencia de mecanismos de regulación a nivel transcripcional que alteran la relación de contenido de las isoformas del Receptor a Progesterona en un área del cerebro y en una etapa del ciclo estral de importancia para la reproducción de la especie.

La aplicación de  $E_2$  exógeno aumenta la expresión de las isoformas del Receptor a Progesterona, y se observa una tendencia a disminuir la cantidad de mRNA de las isoformas con la administración de  $P_4$  exógena, todo esto en el hipotálamo de ratas ovariectomizadas. Los datos exponen al  $E_2$  y  $P_4$ , las principales hormonas esteroides participantes en el evento de conducta sexual, como elementos importantes involucrados en la regulación de los mecanismos de transcripción de las isoformas del Receptor a Progesterona en el área del cerebro que ha sido señalada como la principal implicada en la regulación de la conducta reproductiva.

Se observó un patrón diferencial del estado de metilación del DNA entre los promotores de las isoformas A y B del Receptor a Progesterona en hipotálamo durante el ciclo estral de la rata. En el caso de la isoforma A su promotor se encuentra desmetilado durante la transición, el dato correlaciona con la expresión del mensajero de la isoforma, en conjunto esto empalma con la idea general de que un promotor desmetilado está ligado a una actividad transcripcional de su gen. En el caso del Receptor a Progesterona-B, el promotor tiene cambios en el estado de metilación durante la transición, observándose un aumento en el número de sitios CpG metilados, estos cambios están relacionados con la expresión del mensajero de la isoforma, y correlaciona con el concepto general que se tiene de promotores que presentan metilación del DNA están asociados a un estado no accesible para la maquinaria de transcripción y por lo tanto un silenciamiento del gen.

En el hipotálamo de ratas ovariectomizadas se tiene un patrón diferencial de metilación del DNA de los promotores de las isoformas del Receptor a Progesterona, en el caso de la isoforma A el promotor se encuentra desmetilado, mientras que en el caso de la isoforma B el promotor parece estar metilado; y en ambos promotores la administración exógena de  $E_2$  y/o  $P_4$  no altera el estado de metilación de DNA. En este modelo farmacológico, el estado de metilación diferencial de los promotores correlaciona con la expresión diferencial de los mensajeros de las isoformas, donde el Receptor a Progesterona-A esta aumentado en comparación del Receptor a Progesterona-B. Aunque se ha demostrado que el  $E_2$  y la  $P_4$  regulan la expresión del mensajero de las isoformas del Receptor a Progesterona en hipotálamo de rata, los datos obtenidos muestran que esta regulación de la expresión por parte de las hormonas depende de los estados de metilación del DNA de los promotores de las isoformas que no muestran alterarse directamente por estas dos hormonas.

Los resultados obtenidos en general demuestran que hay un cambio en la expresión de las isoformas del Receptor a Progesterona durante la tarde del proestro la cual correlaciona con un patrón de metilación diferencial en la región promotora del gene que origina las isoformas del Receptor a Progesterona.



## 9. Perspectivas.

El trabajo realizado ha generado resultados interesantes y con esto una serie de preguntas y deducciones que deben ser confirmadas. El estudio con las técnicas utilizadas pudieron evidenciar el estado de metilación de la región promotora del gen del Receptor a Progesterona; el patrón de metilación del DNA mostrado en este trabajo solo esta indicando la presencia o ausencia de esta marca epigenética pero es necesaria la cuantificación de la metilación de los sitios CpG, como se mencionó en la discusión, saber la cantidad de metilación del DNA es importante porque la simple presencia de la marca epigenética no implica silenciamiento de la expresión, se ha demostrado que existe un porcentaje de metilación que esta asociado al silenciamiento de la expresión génica, por lo que todo estudio que trata de ver la implicación de la metilación del DNA como un factor regulador en la expresión esta utilizando técnicas que ven el porcentaje de metilación de los sitios CpG implicados en la regulación, por lo que hace falta hacer estudios sobre el porcentaje de metilación de los sitios CpG metilados que se reportaron en este estudio, una técnica viable es la pirosecuenciación que ha manera de PCR en tiempo real puede cuantificar la metilación del DNA. La cuantificación podrá ayudarnos a encontrar el umbral de metilación que en este modelo esta asociado al silenciamiento de la expresión. El estudio careció de la observación del patrón de metilación del DNA por la técnica BSP en el modelo farmacológico por lo que en el futuro es recomendable hacer este estudio por la técnica de pirosecuenciación

Otro aspecto necesario a explorar es la detección de los factores de transcripción que están asociados a los promotores del gen del receptor a progesterona en esta transición. Como se mencionó en la discusión se ha reportado que el Receptor a Estrógenos  $\alpha$  es el principal activador de la transcripción en el gen del Receptor a Progesterona en otros modelos estudiados, es interesante comprobar si el receptor a estrógenos  $\alpha$  es uno de los factores que este unido al DNA en los periodos de desmetilación que se reportaron en el estudio, y observar el grado de especificidad para cada uno de los dos promotores del Receptor a Progesterona estudiados, esto puede ser posible a través de la técnica de Inmunoprecipitación, que utilizaría anticuerpos específicos para los diferentes factores de transcripción que se quiere explorar, uno de estos es el Receptor a Estrógenos  $\alpha$ , pero

otro factor a explorar es SP1, que como se mencionó en la discusión, se ha reportado su interacción con el promotor del receptor a progesterona y esta interacción depende del estado de metilación de los sitios CpG que estén cercanos a la secuencia consenso de SP1/SP3, la secuencia consenso incluye un sitio CpG, se ha reportado que no es importante el estado de metilación de este sitio tanto como lo es el estado de metilación de los sitios contiguos a la secuencia consenso. Esto tiene relevancia a futuro porque siendo el gen del Receptor a Progesterona un gen blanco de hormonas esteroides como estrógenos y progesterona, es interesante que sin presentar sitios consensos clásicos de reconocimiento de los receptores de estas hormonas es a través de factores de transcripción como SP1 que de manera indirecta pueden ejercer control de la transcripción del Receptor a Progesterona, siendo de gran utilidad la identificación de marcas epigenéticas asociadas con esta clase de control transcripcional de las isoformas del Receptor a Progesterona para iniciar estudios de identificación de patrones conservados en otros modelos que ayuden en el diagnóstico de enfermedades.

Otro aspecto pendiente de estudiar es si la metilación-desmetilación cíclica transitoria observada en el estudio es dependiente de los niveles hormonales endógenos o estos se sirven de este proceso cíclico que es debido a otros factores para poder interactuar con el DNA e iniciar la transcripción. Los datos obtenidos en el modelo farmacológico sobre el estado de metilación de los promotores nos hacen pensar que no son las hormonas esteroides involucradas en la conducta reproductiva las responsables directas de los cambios de metilación del DNA, pero es necesario como se comentó al inicio de estas perspectivas que se haga la técnica BSP en el modelo farmacológico, pues la complejidad de regulación transcripcional por marcas epigenéticas apunta a que son sitios CpG específicos los candidatos que explicarían los cambios que se observan a nivel de transcripción más que el estado de metilación de todo un bloque de sitios CpG, por lo que es necesario comparar los sitios específicos CpG del modelo fisiológico obtenido en este estudio con el modelo farmacológico, esto se puede hacer con la técnica de BSP.

Un aspecto también relevante es la medición de las enzimas encargadas de la metilación, las DNMT's, tanto en su contenido como en su actividad, existen reportes que vinculan

estas enzimas con la metilación y la desmetilación. Estudios *in vitro* han sugerido que DNMT-3A y -3B, conocidas por su actividad de metilación del DNA *de novo*, pueden funcionar como actores en la vía activa de desmetilación del DNA en ciertas situaciones. En condiciones de baja concentración de SAM (S-adenosyl methionine), DNMT-3A y -3B pueden catalizar la deaminación de 5mC a T, la cuál podría ser luego reemplazada por una C intacta por la vía de BER. En un microambiente redox oxidante de cromatina y ausencia de SAM, DNMT-3A y -3B pueden incluso catalizar la conversión directa de 5mC o 5hmC a una C intacta, aunque los mecanismos exactos no han sido aun identificados. Por todo lo anterior se hace relevante que en estudios dónde se explore la metilación del DNA se trabaje con las DNMT's ya que serán una herramienta útil para pensar el proceso de metilación transitoria cíclica del DNA.

## 10. Referencias.

- Abraham, G. E. (1975). "Radioimmunoassay of steroids in biological fluids." J Steroid Biochem **6**(3-4): 261-270.
- Ahuja, N., Q. Li, A. L. Mohan, S. B. Baylin and J. P. Issa (1998). "Aging and DNA methylation in colorectal mucosa and cancer." Cancer Res **58**(23): 5489-5494.
- Bagchi, M. K., S. Y. Tsai, M. J. Tsai and B. W. O'Malley (1992). "Ligand and DNA-dependent phosphorylation of human progesterone receptor in vitro." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(7): 2664-2668.
- Beato, M., P. Herrlich and G. Schutz (1995). "Steroid hormone receptors: many actors in search of a plot." Cell **83**(6): 851-857.
- Bethea, C. L. and A. A. Widmann (1998). "Differential expression of progestin receptor isoforms in the hypothalamus, pituitary, and endometrium of rhesus macaques." Endocrinology **139**(2): 677-687.
- Blaustein, J. D. (2008). "Neuroendocrine Regulation of Feminine Sexual Behavior: Lessons from Rodent Models and Thoughts About Humans." Annual Review of Psychology **59**(1): 93-118.
- Brinton, R. D., R. F. Thompson, M. R. Foy, M. Baudry, J. Wang, C. E. Finch, T. E. Morgan, C. J. Pike, W. J. Mack, F. Z. Stanczyk and J. Nilsen (2008). "Progesterone receptors: form and function in brain." Front Neuroendocrinol **29**(2): 313-339.
- Camacho-Arroyo, I., A. Gonzalez-Arenas and G. Gonzalez-Moran (2007). "Ontogenic variations in the content and distribution of progesterone receptor isoforms in the reproductive tract and brain of chicks." Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol **146**(4): 644-652.
- Camacho-Arroyo, I., C. Guerra-Araiza and M. A. Cerbon (1998). "Progesterone receptor isoforms are differentially regulated by sex steroids in the rat forebrain." Neuroreport **9**(18): 3993-3996.
- Canteras, N. S., R. B. Simerly and L. W. Swanson (1994). "Organization of projections from the ventromedial nucleus of the hypothalamus: a Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin study in the rat." J Comp Neurol **348**(1): 41-79.
- Canteras, N. S., R. B. Simerly and L. W. Swanson (1995). "Organization of projections from the medial nucleus of the amygdala: a PHAL study in the rat." J Comp Neurol **360**(2): 213-245.
- Canteras, N. S. and L. W. Swanson (1992). "Projections of the ventral subiculum to the amygdala, septum, and hypothalamus: a PHAL anterograde tract-tracing study in the rat." J Comp Neurol **324**(2): 180-194.
- Duffy, D. M., T. R. Wells, G. J. Haluska and R. L. Stouffer (1997). "The ratio of progesterone receptor isoforms changes in the monkey corpus luteum during the luteal phase of the menstrual cycle." Biol Reprod **57**(4): 693-699.
- Edwards, D. A. and J. K. Pfeifle (1983). "Hormonal control of receptivity, proceptivity and sexual motivation." Physiol Behav **30**(3): 437-443.
- Edwards, D. P., S. E. Wardell and V. Boonyaratanakornkit (2002). "Progesterone receptor interacting coregulatory proteins and cross talk with cell signaling pathways." J Steroid Biochem Mol Biol **83**(1-5): 173-186.
- Erskine, M. S. (1989). "Solicitation behavior in the estrous female rat: a review." Horm Behav **23**(4): 473-502.
- Evans, R. M. (1988). "The steroid and thyroid hormone receptor superfamily." Science **240**(4854): 889-895.

- Fahrbach, S. E., J. I. Morrell and D. W. Pfaff (1989). "Studies of ventromedial hypothalamic afferents in the rat using three methods of HRP application." Exp Brain Res **77**(2): 221-233.
- Flanagan-Cato, L. M., B. J. Lee and L. H. Calizo (2006). "Co-localization of midbrain projections, progesterin receptors, and mating-induced fos in the hypothalamic ventromedial nucleus of the female rat." Horm Behav **50**(1): 52-60.
- Flototto, T., D. Niederacher, D. Hohmann, T. Heimerzheim, P. Dall, S. Djahansouzi, H. G. Bender and B. Hanstein (2004). "Molecular mechanism of estrogen receptor (ER)alpha-specific, estradiol-dependent expression of the progesterone receptor (PR) B-isoform." J Steroid Biochem Mol Biol **88**(2): 131-142.
- Freeman, M. E. (2006). Chapter 43 - Neuroendocrine Control of the Ovarian Cycle of the Rat. Knobil and Neill's Physiology of Reproduction (Third Edition). J. D. N. M. P. W. P. R. G. C. M. d. K. S. R. M. Wassarman. St Louis, Academic Press: 2327-2388.
- Fujimoto, J., S. Ichigo, R. Hirose, H. Sakaguchi and T. Tamaya (1997). "Clinical implication of expression of progesterone receptor form A and B mRNAs in secondary spreading of gynecologic cancers." J Steroid Biochem Mol Biol **62**(5-6): 449-454.
- Gaudet, M. M., M. Campan, J. D. Figueroa, X. R. Yang, J. Lissowska, B. Peplonska, L. A. Brinton, D. L. Rimm, P. W. Laird, M. Garcia-Closas and M. E. Sherman (2009). "DNA Hypermethylation of ESR1 and PGR in Breast Cancer: Pathologic and Epidemiologic Associations." Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention **18**(11): 3036-3043.
- Gaudet, M. M., M. Campan, J. D. Figueroa, X. R. Yang, J. Lissowska, B. Peplonska, L. A. Brinton, D. L. Rimm, P. W. Laird, M. Garcia-Closas and M. E. Sherman (2009). "DNA hypermethylation of ESR1 and PGR in breast cancer: pathologic and epidemiologic associations." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **18**(11): 3036-3043.
- Gavin, D. P., K. A. Chase and R. P. Sharma (2013). "Active DNA demethylation in post-mitotic neurons: a reason for optimism." Neuropharmacology **75**: 233-245.
- Giangrande, P. H. and D. P. McDonnell (1999). "The A and B isoforms of the human progesterone receptor: two functionally different transcription factors encoded by a single gene." Recent Prog Horm Res **54**: 291-313; discussion 313-294.
- Goldberg, A. D., C. D. Allis and E. Bernstein (2007). "Epigenetics: a landscape takes shape." Cell **128**(4): 635-638.
- Gonzalez-Flores, O., C. Guerra-Araiza, M. Cerbon, I. Camacho-Arroyo and A. M. Etgen (2004). "The 26S proteasome participates in the sequential inhibition of estrous behavior induced by progesterone in rats." Endocrinology **145**(5): 2328-2336.
- Graham, J. D., C. Yeates, R. L. Balleine, S. S. Harvey, J. S. Milliken, A. M. Bilous and C. L. Clarke (1996). "Progesterone receptor A and B protein expression in human breast cancer." J Steroid Biochem Mol Biol **56**(1-6 Spec No): 93-98.
- Guerra-Araiza, C. and I. Camacho-Arroyo (2000). "[Progesterone receptor isoforms: function and regulation]." Rev Invest Clin **52**(6): 686-691.
- Guerra-Araiza, C., M. A. Cerbon, S. Morimoto and I. Camacho-Arroyo (2000). "Progesterone receptor isoforms expression pattern in the rat brain during the estrous cycle." Life Sci **66**(18): 1743-1752.

- Guerra-Araiza, C., O. Villamar-Cruz, A. Gonzalez-Arenas, R. Chavira and I. Camacho-Arroyo (2003). "Changes in progesterone receptor isoforms content in the rat brain during the oestrous cycle and after oestradiol and progesterone treatments." *J Neuroendocrinol* **15**(10): 984-990.
- Hansberg-Pastor, V., A. Gonzalez-Arenas, M. A. Pena-Ortiz, E. Garcia-Gomez, M. Rodriguez-Dorantes and I. Camacho-Arroyo (2013). "The role of DNA methylation and histone acetylation in the regulation of progesterone receptor isoforms expression in human astrocytoma cell lines." *Steroids* **78**(5): 500-507.
- Hashimoto, I., D. M. Henricks, L. L. Anderson and R. M. Melampy (1968). "Progesterone and pregn-4-en-20 alpha-ol-3-one in ovarian venous blood during various reproductive states in the rat." *Endocrinology* **82**(2): 333-341.
- Hashimoto, I. and W. G. Wiest (1969). "Correlation of the secretion of ovarian steroids with function of a single generation of corpora lutea in the immature rat." *Endocrinology* **84**(4): 873-885.
- Hovland, A. R., R. L. Powell, G. S. Takimoto, L. Tung and K. B. Horwitz (1998). "An N-terminal inhibitory function, IF, suppresses transcription by the A-isoform but not the B-isoform of human progesterone receptors." *J Biol Chem* **273**(10): 5455-5460.
- Issa, J. P., S. B. Baylin and S. A. Belinsky (1996). "Methylation of the estrogen receptor CpG island in lung tumors is related to the specific type of carcinogen exposure." *Cancer Res* **56**(16): 3655-3658.
- Jackson, T. A., J. K. Richer, D. L. Bain, G. S. Takimoto, L. Tung and K. B. Horwitz (1997). "The partial agonist activity of antagonist-occupied steroid receptors is controlled by a novel hinge domain-binding coactivator L7/SPA and the corepressors N-CoR or SMRT." *Mol Endocrinol* **11**(6): 693-705.
- Jichan, N., L. Xishi and S. W. Guo (2010). "Promoter hypermethylation of progesterone receptor isoform B (PR-B) in adenomyosis and its rectification by a histone deacetylase inhibitor and a demethylation agent." *Reprod Sci* **17**(11): 995-1005.
- Kangaspeska, S., B. Stride, R. Metivier, M. Polycarpou-Schwarz, D. Ibberson, R. P. Carmouche, V. Benes, F. Gannon and G. Reid (2008). "Transient cyclical methylation of promoter DNA." *Nature* **452**(7183): 112-115.
- Kastner, P., A. Krust, B. Turcotte, U. Stropp, L. Tora, H. Gronemeyer and P. Chambon (1990). "Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B." *EMBO J* **9**(5): 1603-1614.
- Kerjean, A., J. M. Dupont, C. Vasseur, D. Le Tessier, L. Cuisset, A. Paldi, P. Jouannet and M. Jeanpierre (2000). "Establishment of the paternal methylation imprint of the human H19 and MEST/PEG1 genes during spermatogenesis." *Hum Mol Genet* **9**(14): 2183-2187.
- Klein-Hitpass, L., S. Y. Tsai, N. L. Weigel, G. F. Allan, D. Riley, R. Rodriguez, W. T. Schrader, M. J. Tsai and B. W. O'Malley (1990). "The progesterone receptor stimulates cell-free transcription by enhancing the formation of a stable preinitiation complex." *Cell* **60**(2): 247-257.
- Kohli, R. M. and Y. Zhang (2013). "TET enzymes, TDG and the dynamics of DNA demethylation." *Nature* **502**(7472): 472-479.
- Kraus, W. L., M. M. Montano and B. S. Katzenellenbogen (1993). "Cloning of the rat progesterone receptor gene 5'-region and identification of two functionally distinct promoters." *Mol Endocrinol* **7**(12): 1603-1616.

- La Vaque, T. J. and C. H. Rodgers (1975). "Recovery of mating behavior in the female rat following VMH lesions." Physiol Behav **14**(1): 59-63.
- Lee, B., H. Du and H. S. Taylor (2009). "Experimental murine endometriosis induces DNA methylation and altered gene expression in eutopic endometrium." Biol Reprod **80**(1): 79-85.
- Li, L., S. He, J. M. Sun and J. R. Davie (2004). "Gene regulation by Sp1 and Sp3." Biochem Cell Biol **82**(4): 460-471.
- Li, X., C. Chen, H. Luo, J. C. van Velkinburgh, B. Ni and Q. Chang (2014). "Decreased DNA Methylations at the Progesterone Receptor Promoter A Induce Functional Progesterone Withdrawal in Human Parturition." Reproductive Sciences **21**(7): 898-905.
- Liu, B. and L. A. Arbogast (2009). "Gene expression profiles of intracellular and membrane progesterone receptor isoforms in the mediobasal hypothalamus during pro-oestrus." J Neuroendocrinol **21**(12): 993-1000.
- Liu, Z. J., X. B. Zhang, Y. Zhang and X. Yang (2004). "Progesterone receptor gene inactivation and CpG island hypermethylation in human leukemia cancer cells." FEBS Lett **567**(2-3): 327-332.
- Lydon, J. P., F. J. DeMayo, C. R. Funk, S. K. Mani, A. R. Hughes, C. A. Montgomery, Jr., G. Shyamala, O. M. Conneely and B. W. O'Malley (1995). "Mice lacking progesterone receptor exhibit pleiotropic reproductive abnormalities." Genes Dev **9**(18): 2266-2278.
- Mandl, A. M. (1951). "Cyclical Changes in the Vaginal Smear of Adult Ovariectomized Rats." Journal of Experimental Biology **28**(4): 585-592.
- Mandl, A. M. (1951). "The Phases of the Oestrous Cycle in the Adult White Rat." Journal of Experimental Biology **28**(4): 576-584.
- Mani, S. K., A. M. Reyna, J. Z. Chen, B. Mulac-Jericevic and O. M. Conneely (2006). "Differential response of progesterone receptor isoforms in hormone-dependent and -independent facilitation of female sexual receptivity." Mol Endocrinol **20**(6): 1322-1332.
- Mendoza-Garcés, L., I. Camacho-Arroyo and M. A. Cerbon (2010). "Effects of mating on progesterone receptor isoforms in rat hypothalamus." Neuroreport **21**(7): 513-516.
- Meng, H., Y. Cao, J. Qin, X. Song, Q. Zhang, Y. Shi and L. Cao (2015). "DNA Methylation, Its Mediators and Genome Integrity." Int J Biol Sci **11**(5): 604-617.
- Menger, Y., M. Bettscheider, C. Murgatroyd and D. Spengler (2010). "Sex differences in brain epigenetics." Epigenomics **2**(6): 807-821.
- Merlino, A. A., T. N. Welsh, H. Tan, L. J. Yi, V. Cannon, B. M. Mercer and S. Mesiano (2007). "Nuclear Progesterone Receptors in the Human Pregnancy Myometrium: Evidence that Parturition Involves Functional Progesterone Withdrawal Mediated by Increased Expression of Progesterone Receptor-A." The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism **92**(5): 1927-1933.
- Mikeska, T., I. L. Candiloro and A. Dobrovic (2010). "The implications of heterogeneous DNA methylation for the accurate quantification of methylation." Epigenomics **2**(4): 561-573.
- Millhouse, O. E. (1973). "The organization of the ventromedial hypothalamic nucleus." Brain Res **55**(1): 71-87.
- Mitchell, C. M., S. D. Sykes, X. Pan, K. G. Pringle, E. R. Lumbers, J. J. Hirst and T. Zakar (2013). "Inflammatory and steroid receptor gene methylation in the human amnion and decidua." J Mol Endocrinol **50**(2): 267-277.

- Moffatt, C. A., E. F. Rissman, M. A. Shupnik and J. D. Blaustein (1998). "Induction of progestin receptors by estradiol in the forebrain of estrogen receptor-alpha gene-disrupted mice." *J Neurosci* **18**(22): 9556-9563.
- Molenda-Figueira, H. A., C. A. Williams, A. L. Griffin, E. M. Rutledge, J. D. Blaustein and M. J. Tetel (2006). "Nuclear receptor coactivators function in estrogen receptor- and progestin receptor-dependent aspects of sexual behavior in female rats." *Horm Behav* **50**(3): 383-392.
- Mulac-Jericevic, B., R. A. Mullinax, F. J. DeMayo, J. P. Lydon and O. M. Conneely (2000). "Subgroup of reproductive functions of progesterone mediated by progesterone receptor-B isoform." *Science* **289**(5485): 1751-1754.
- Nequin, L. G., J. Alvarez and N. B. Schwartz (1979). "Measurement of serum steroid and gonadotropin levels and uterine and ovarian variables throughout 4 day and 5 day estrous cycles in the rat." *Biol Reprod* **20**(3): 659-670.
- O'Malley, B. (1990). "The steroid receptor superfamily: more excitement predicted for the future." *Mol Endocrinol* **4**(3): 363-369.
- Oomura, Y., S. Aou, Y. Koyama, I. Fujita and H. Yoshimatsu (1988). "Central control of sexual behavior." *Brain Res Bull* **20**(6): 863-870.
- Orti, E., J. E. Bodwell and A. Munck (1992). "Phosphorylation of steroid hormone receptors." *Endocr Rev* **13**(1): 105-128.
- Pathiraja, T. N., P. B. Shetty, J. Jelinek, R. He, R. Hartmaier, A. L. Margossian, S. G. Hilsenbeck, J.-P. J. Issa and S. Oesterreich (2011). "Progesterone Receptor Isoform-Specific Promoter Methylation: Association of PRA Promoter Methylation with Worse Outcome in Breast Cancer Patients." *Clinical Cancer Research* **17**(12): 4177-4186.
- Paxinos, G., C. R. Watson and P. C. Emson (1980). "AChE-stained horizontal sections of the rat brain in stereotaxic coordinates." *J Neurosci Methods* **3**(2): 129-149.
- Pleim, E. T. and R. J. Barfield (1988). "Progesterone versus estrogen facilitation of female sexual behavior by intracranial administration to female rats." *Horm Behav* **22**(2): 150-159.
- Robertson, J. A., Y. Farnell, L. S. Lindahl and N. H. Ing (2002). "Estradiol up-regulates estrogen receptor messenger ribonucleic acid in endometrial carcinoma (Ishikawa) cells by stabilizing the message." *J Mol Endocrinol* **29**(1): 125-135.
- Sartorius, C. A., M. Y. Melville, A. R. Hovland, L. Tung, G. S. Takimoto and K. B. Horwitz (1994). "A third transactivation function (AF3) of human progesterone receptors located in the unique N-terminal segment of the B-isoform." *Mol Endocrinol* **8**(10): 1347-1360.
- Scarpin, K. M., J. D. Graham, P. A. Mote and C. L. Clarke (2009). "Progesterone action in human tissues: regulation by progesterone receptor (PR) isoform expression, nuclear positioning and coregulator expression." *Nucl Recept Signal* **7**: e009.
- Shao, R. (2013). "Progesterone receptor isoforms A and B: new insights into the mechanism of progesterone resistance for the treatment of endometrial carcinoma." *Ecancermedicalscience* **7**.
- Shyamala, G., W. Schneider and D. Schott (1990). "Developmental regulation of murine mammary progesterone receptor gene expression." *Endocrinology* **126**(6): 2882-2889.



- Simerly, R. B. and L. W. Swanson (1988). "Projections of the medial preoptic nucleus: a Phaseolus vulgaris leucoagglutinin anterograde tract-tracing study in the rat." *J Comp Neurol* **270**(2): 209-242.
- Swanson, L. W. (1992). Brain maps : structure of the rat brain. Amsterdam ; New York, Elsevier.
- Swanson, L. W. (2011). Organization of Mammalian Neuroendocrine System. Comprehensive Physiology, John Wiley & Sons, Inc.
- Swanson, L. W., P. E. Sawchenko, R. W. Lind and J. H. Rho (1987). "The CRH motoneuron: differential peptide regulation in neurons with possible synaptic, paracrine, and endocrine outputs." *Ann N Y Acad Sci* **512**: 12-23.
- Takimoto, G. S., D. M. Tasset, A. C. Eppert and K. B. Horwitz (1992). "Hormone-induced progesterone receptor phosphorylation consists of sequential DNA-independent and DNA-dependent stages: analysis with zinc finger mutants and the progesterone antagonist ZK98299." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(7): 3050-3054.
- Vazquez-Martinez, E. R., L. Mendoza-Garcés, E. Vergara-Castaneda and M. Cerbon (2014). "Epigenetic regulation of Progesterone Receptor isoforms: from classical models to the sexual brain." *Mol Cell Endocrinol* **392**(1-2): 115-124.
- Wen, D. X., Y. F. Xu, D. E. Mais, M. E. Goldman and D. P. McDonnell (1994). "The A and B isoforms of the human progesterone receptor operate through distinct signaling pathways within target cells." *Mol Cell Biol* **14**(12): 8356-8364.
- Zhang, W., L. Wang, Q. Fan, X. Wu, F. Wang, R. Wang, Z. Ma, J. Yang and S. H. Lu (2011). "Arsenic trioxide re-sensitizes ERalpha-negative breast cancer cells to endocrine therapy by restoring ERalpha expression in vitro and in vivo." *Oncol Rep* **26**(3): 621-628.

## **11. Anexos.**

# Effects of mating on progesterone receptor isoforms in rat hypothalamus

Luciano Mendoza-Garcés, Ignacio Camacho-Arroyo and Marco A. Cerbón

In rodents, the display of sexual behavior during proestrus-estrus transition depends on the effect of estradiol and progesterone. Progesterone exerts its effects through intracellular receptor (PR) of which two isoforms (PR-A and PR-B) are found, with different regulation and function. In this study the effects of mating on the expression pattern of PR isoforms in the hypothalamus were investigated during proestrus-estrus transition by using western blot. PR-B isoform content significantly diminished during proestrus-estrus transition both in mated and nonmated female rats. In contrast, PR-A isoform content significantly increases during this period in nonmated rats, whereas it does not change in mated animals. These data show that PR isoforms are differentially expressed throughout proestrus-estrus

transition and that mating modifies PR isoforms expression in the hypothalamus of the rat. *NeuroReport* 21:513–516 © 2010 Wolters Kluwer Health | Lippincott Williams & Wilkins.

NeuroReport 2010, 21:513–516

Keywords: estrous cycle, hypothalamus, mating, progesterone, progesterone receptor

Facultad de Química, Departamento de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Coyoacán, México, D.F., Mexico

Correspondence to Dr Marco A. Cerbón, MD, PhD, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Facultad de Química, Edificio F, Mexico, México D.F. 04510, Mexico  
Tel: +52 55 5622 3820; fax: +52 55 5616 2010;  
e-mail: mcerbon85@yahoo.com.mx

Received 7 December 2009 accepted 23 February 2010

## Introduction

Progesterone ( $P_4$ ) participates in the regulation of several functions in the brain related to reproduction such as the display of sexual behavior and ovulation [1,2]. Many  $P_4$  effects are mediated by its interaction with its specific nuclear receptor (PR), a ligand dependent transcription factor that regulates the transcription of diverse genes [3].

PR is expressed as two main isoforms, PR-A (86 kDa) and PR-B (110 kDa), derived from the same gene as a result of the transcription of two alternate estrogen-inducible promoters, and the translation initiation sites at two different AUG codons [4,5]. PR-A and PR-B only differ in 165 additional amino acids located at the N-terminal of the latter. This region has a transactivation function that is specific for PR-B and is required for target genes that can be activated by PR-B but not by PR-A [6]. Studies in mice with selective PR-A knockout (PR-A KO  $-/-$ ) and/or PR-B knockout (PR-B KO  $-/-$ ), provide compelling evidence that the biological activities of the two PR isoforms are distinct as they contribute differentially to  $P_4$ -dependent gene expression and physiological responses in the female reproductive tract, mammary gland and brain [7,8]. PR-A/PR-B ratio varies in all tissues depending on age, sex, and hormonal status. Estradiol ( $E_2$ ) is the major modulator of PR expression and also influences the PR-A/PR-B balance [9].

In different brain regions of intact adult female rats the expression of PR mRNA isoforms changes during the estrus cycle. PR-B shows a higher expression than PR-A throughout the cycle in the hypothalamus, preoptic area,

and frontal cortex, but not in hippocampus. In the hypothalamus, the main regulator of female sexual behavior [10], the highest expression of PR-B was found on proestrus day; in the preoptic area in metestrus, and in the frontal cortex in the diestrus [11]. At the protein level, in the hypothalamus, PR-A showed the lowest content on the day of diestrus, while PR-B content does not change in this region. In contrast, in the preoptic area, the content of both PR isoforms was highest at diestrus, and lowest on the day of estrus. No significant changes in PR isoform content in the hippocampus were observed during the estrous cycle. In the frontal cortex, the lowest PR-B content was observed on the day of estrus without significant changes in PR-A [12]. These data indicate that PR isoforms expression is tissue-specific and variable during the estrous cycle.

Studies using PR antagonists, PR antisense oligonucleotides, and the mutant mice with targeted deletion of the PR gene show that  $P_4$  facilitation of lordosis response involves a classical ligand-dependent PR-mediated mechanism in the female rodents [13].

Many aspects of female sexual behavior are influenced not only by hormones, but also by sensory stimulation during mating. The vaginal-cervical stimulation received during intromissions and ejaculations is particularly important for inducing changes in sexual behavior and reproductive physiology [14].

Vaginal-cervical stimulation increases sexual receptivity in  $E_2$ -primed, OVX female rats. This increase can be blocked by  $P_4$  antagonists [15]. In  $E_2$ -primed OVX rats,

PR-immunoreactive cells were seen in the medial preoptic nucleus, ventromedial nucleus of the hypothalamus, and arcuate nucleus. Vaginal–cervical stimulation decreased PR-immunoreactivity in the medial preoptic nucleus compared to control perineal stimulation [16].

There are no studies about the effects of mating on the content of PR isoforms in the brain of intact rats. Therefore, we studied the effects of mating on PR isoforms content in the hypothalamus of the rat during the proestrus-estrus transition.

## Methods

All animals were maintained and handled in accordance with the Guidelines of the Mexican Law of Animal Protection. Rats were purchased from the UNAM-Harlan Center. Adult female Wistar rats (200–250 g) were maintained under a 14:10 h light/dark cycle (lights on 06:00 h), with food and water available *ad libitum*. Animals with at least four regular 4-day estrous cycles, as determined by daily vaginal smears, were used. Rats were divided into two groups: one of nonmated rats and the other one of rats that were mated with an expert male Wistar rat starting at 16:00 h of proestrus until the time they were killed. Rats from the mated group that presented spermatozooids in their vaginal smear were used. Euthanasia was performed by decapitation at 13:00, 17:00, and 21:00 h of proestrus, and at 00:00 and 07:00 of estrus days. Once the rat brain was obtained, the hypothalamus was excised according to the Atlas of Paxinos and Watson [17], and was immediately processed for protein extraction.

The hypothalamus was homogenized in Tris dithiothreitol glycerol lysis buffer with protease inhibitors (10 mM Tris-HCl, 1 mM DTT, 30% glycerol, 1% Triton x-100, 15 mM sodium azide, 1 mM EDTA, 4 µg/ml leupeptin, 22 µg/ml aprotinin, 1 mM Phenyl Methyl Sulfonyl Fluoride, 1 mM sodium ortovanadate). Proteins were obtained by centrifugation for 15 min at 15 000 rpm at 4°C and quantified by the Bradford method (BioRad Laboratories, Hercules, California, USA). Proteins (80 µg) were separated by electrophoresis in a 7.5% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis at 95V. Prestained markers (BioRad Laboratories) were included for size determination. Gels were transferred to a polyvinylidene fluoride membrane (Millipore Corporation, Billerica, Massachusetts, USA) using a semidry transfer system (BioRad Laboratories). Membranes were blocked for 15 min at room temperature, with 10% nonfat dry milk and 0.2% Tween-20. They were incubated overnight at 4°C with rabbit anti-PR polyclonal antibody 1:250 (sc-539, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, California, USA), which recognizes both PR isoforms with similar affinity. For negative controls, PR antibody was replaced by normal goat IgG (sc-2043, Santa Cruz Biotechnology, Inc.). Blots were incubated for 1 h with a

1:1500 dilution of goat anti-rabbit IgG conjugated to horseradish peroxidase (sc-2030, Santa Cruz Biotechnology Inc.) and detected by chemiluminescence with the ECL kit (Amersham Piscataway, New Jersey, USA). Membranes were stripped with glycine (0.1 M, pH 2.5; 0.5% SDS) overnight at 4°C and incubated with a mouse monoclonal antibody against  $\alpha$ -tubulin 1:10 000 (T7064, Sigma-Aldrich Co., St Louis, Missouri, USA) for 1 h at room temperature, and was used as a loading control. Blots were then incubated for 30 min with a 1:10 000 dilution of goat anti-mouse IgG conjugated to horseradish peroxidase (sc-2005, Santa Cruz Biotechnology, Inc.). Signals were detected by chemiluminescence. Densitometrical analysis was performed using a Scan Primax Colorado 600p apparatus (Primax, Utrecht, The Netherlands) and Scion Image software (Scion Corp., Frederick, Maryland, USA). PR isoforms content was normalized to that of  $\alpha$ -tubulin.

E<sub>2</sub> and P<sub>4</sub> levels were measured by radioimmunoassay. Specific double antibody radioimmunoassay was performed in independent serum samples from groups of four rats for each experimental condition. All samples were stored at -70°C until analyzed. E<sub>2</sub> and P<sub>4</sub> assessment was carried out as previously described [18]. Using the solid-phase <sup>125</sup>I technique, with the Coat-A-Count kit (Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, California, USA), following the method described by the manufacturer. The sensitivity of the assays was 5.4 pg/ml for E<sub>2</sub> and 8.3 ng/ml for P<sub>4</sub>. The intra-assay and interassay coefficients of variation were of 5.3 and 8%, respectively for E<sub>2</sub>, and 6.5 and 10%, respectively, for P<sub>4</sub>.

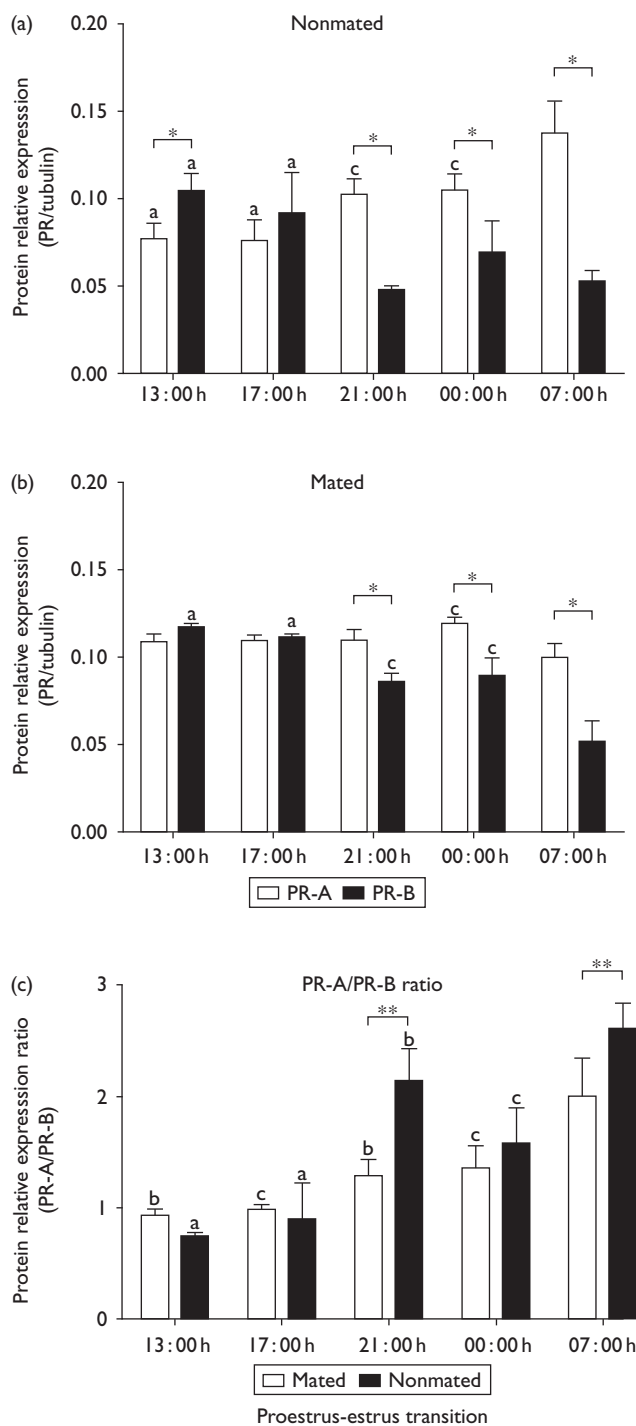
Data were analyzed by a two-way analysis of variance followed by Bonferroni post test. Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, California, USA) was used to calculate the probability values.

## Results

PR isoforms content was assessed by Western blot analysis in the hypothalamus of nonmated and mated rats. Two bands of 116 and 88 kDa corresponding to PR-B and PR-A, respectively, and a band of 55 kDa corresponding to alpha tubulin were detected.

In the hypothalamus of nonmated and mated rats a differential PR isoforms content pattern was observed during the proestrus-estrus transition. We found that in nonmated rats PR-A content was increased at 21:00 h of proestrus, 00:00 and 7:00 h of estrus day in comparison to 13:00 h of proestrus day, whereas PR-B isoform content significantly diminished at 21:00 h of proestrus, 00:00 and 7:00 h of estrus days in comparison to 13:00 h of proestrus day (Fig. 1a). In contrast, in the hypothalamus of mated rats, PR-A content did not exhibit a significant increase throughout the proestrus-estrus transition, on the contrary, a significant diminution was observed at 07:00 h with respect to 00:00 h of estrus day. In contrast, PR-B

Fig. 1



PR isoforms content in the hypothalamus of female rats during the proestrus-estrus transition. (a and b) Densitometric analysis of Western blot experiments of PR isoforms content in hypothalamus of nonmated and mated rats. (c) PR-A/PR-B ratio analysis of nonmated and mated rats. Results are mean  $\pm$  SD ( $n=4$ ), \* $P<0.05$  compared with PR-B at the same hour. \*\* $P<0.05$  compared with nonmated at the same hour. <sup>a</sup> $P<0.05$  compared with 21:00, 00:00, and 07:00 h of the same isoform or group. <sup>b</sup> $P<0.05$  compared with 00:00 and 07:00 h of the same isoform or group. <sup>c</sup> $P<0.05$  compared with 07:00 h of the same isoform or group.

content significantly diminished at 21:00 h of proestrus, 00:00 and 07:00 h of estrus as compared with 13:00 h of proestrus day. The lowest content of PR-B was observed at 07:00 h of estrus day (Fig. 1b).

PR-A/PR-B ratio analysis showed that in the case of the nonmated group, PR-B was the predominant isoform at 13:00 h of proestrus (Fig. 1c). Interestingly, PR-A was the predominant isoform from 21:00 to 07:00 h in mated and nonmated rats with a significant increase at 07:00 h of estrus day with respect to the other hours of proestrus-estrus transition in both groups. Interestingly, the PR-A isoform was significantly more abundant in nonmated rats at 21:00 h of proestrus and 07:00 h of estrus day (Fig. 1c).

The values of hormones analyzed by radioimmunoassay confirmed the proestrus-estrus transition. A similar pattern of  $E_2$  and  $P_4$  levels in mated and nonmated animals was observed (Table 1).

**Discussion**

In this study we show that the expression of PR-A and PR-B in the hypothalamus of mated and nonmated rats is differentially regulated during proestrus-estrus transition.

It has been reported that  $E_2$  increases the protein content of PR isoforms, whereas  $P_4$  treatment downregulates their content after 3 h [12]. These data suggest that the high content of PR-B at 13:00 and 17:00 h of proestrus in both mated and nonmated rats should reflect the effects of high  $E_2$  serum concentration (Table 1). The decrease in PR-B content in the morning of estrous day could be because of the increase in  $P_4$  serum concentration in the afternoon of proestrus because  $P_4$  downregulates PR isoforms content in the rat hypothalamus [12]. A differential turnover of PR isoforms induced by  $P_4$  in brain has been reported [19,20].

Changes in PR-B content during proestrus-estrus transition could be involved in the display of sexual behavior. Recent reports exploring the role of PR isoforms in lordosis behavior induced by  $P_4$  and two of its ring A reduced metabolites (5 $\alpha$ DHP and 5 $\beta$ ,3 $\beta$ -Pgl) in adult OVX rats through the intracerebral administration of

Table 1  $P_4$  and  $E_2$  Serum levels during proestrus-estrus transition in female rats

Hour	$E_2$ (pg/ml)		$P_4$ (ng/ml)	
	Nonmated	Mated	Nonmated	Mated
13:00	74.56 $\pm$ 10.13*	47.44 $\pm$ 13.40**	04.38 $\pm$ 0.34†	09.58 $\pm$ 2.55†
17:00	68.06 $\pm$ 13.11*	66.91 $\pm$ 10.32***	08.07 $\pm$ 1.51†	32.02 $\pm$ 4.54‡
21:00	20.40 $\pm$ 03.86	48.24 $\pm$ 10.22**	42.43 $\pm$ 1.07**	63.52 $\pm$ 4.98**
00:00	10.70 $\pm$ 02.41	27.07 $\pm$ 08.10	37.99 $\pm$ 1.85**	42.48 $\pm$ 3.62**
07:00	13.40 $\pm$ 02.90	23.30 $\pm$ 04.49	07.01 $\pm$ 1.81	05.50 $\pm$ 1.36

Results are mean  $\pm$  SEM ( $n=4$ ).

\* $P<0.05$  compared with 21:00, 00:00, and 07:00 of the same group.

\*\* $P<0.05$  compared with 07:00 of the same group.

\*\*\* $P<0.05$  compared with 00:00 and 07:00 of the same group.

† $P<0.05$  compared with 21:00 and 00:00 of the same group.

‡ $P<0.05$  compared with 21:00 and 07:00 of the same group.

PR-B and total PR (PR-A + PR-B) antisense oligonucleotides, assign an essential role to PR-B for the display of lordosis behavior in rats [21].

In mated animals, PR-A content was constant throughout proestrus-estrus transition, in contrast to nonmated rats where PR-A content increased from proestrus night until the morning of estrus day compared with the afternoon of proestrus. Mating stimuli can influence sexual receptive behavior through ligand-independent activation of PR [15,22]. Mating could induce differential PR-A phosphorylation in comparison with nonmated rats that would mark this isoform for its degradation in mated rats.

## Conclusion

The expression of PR isoforms throughout proestrus-estrus transition is differentially regulated in the hypothalamus of mated and nonmated rats. PR-A isoform content increases during proestrus-estrus in nonmated female rats without any significant increase in mated animals. These data suggest that mating regulates PR-A expression in the hypothalamus of the female rat.

## Acknowledgements

This study was supported by grants from National Council for Science and Technology, and PAPIIT and PAIP from National Autonomous University of Mexico.

## References

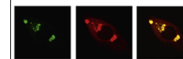
- Camacho-Arroyo I, Pasapera AM, Pérez-Palacios G, Cerbón MA. Progesterone and its metabolites in the function of the central nervous system. *Rev Invest Clin* 1995; **47**:329–340.
- Graham JD, Clarke CL. Physiological action of progesterone in target tissues. *Endocr Rev* 1997; **18**:502–519.
- Truss M, Beato M. Steroid hormone receptor and interaction with deoxyribonucleic acid and transcription factors. *Endocr Rev* 1993; **14**:459–479.
- Krauss LW, Montano M, Katzenellenbogen B. Cloning of the rat progesterone receptor gene 5' -region and identification of two functionally distinct promoters. *Mol Endocrinol* 1993; **7**:1603–1616.
- Ilenchuk TT, Walters MR. Rat uterine progesterone receptor analyzed by [<sup>3</sup>H] R5020 photoaffinity labeling, evidence that the A and B subunits are not equimolar. *Endocrinology* 1987; **120**:1449–1456.
- Wen DX, Xu YF, Mais DE, Goldman ME, McDonnell DP. The A and B isoforms of the human progesterone receptor operate through distinct signaling pathways within target cells. *Mol Cell Biol* 1994; **14**:8356–8364.
- Mani SK, Reyna AM, Chen JZ, Mulac-Jericevic B, Conneely OM. Differential response of progesterone receptor isoforms in hormone-dependent and - independent facilitation of female sexual receptivity. *Mol Endocrinol* 2006; **20**:1322–1332.
- Lange CA, Shen T, Horwitz KB. Phosphorylation of human progesterone receptors at serine-294 by mitogen-activated protein kinase signals their degradation by the 26S proteasome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; **97**:1032–1037.
- Isaksson E, Wang H, Sahlin L, von Schoultz B, Cline JM, von Schoultz E. Effects of long-term HRT and tamoxifen on the expression of progesterone receptors A and B in breast tissue from surgically postmenopausal cynomolgus macaques. *Breast Cancer Res Treat* 2003; **79**:233–239.
- White MM, Sheffer I, Teeter J, Apostolakis EM. Hypothalamic progesterone receptor-A mediates gonadotropin surges, self priming and receptivity in estrogen-primed female mice. *J Mol Endocrinol* 2007; **38**:35–50.
- Guerra-Araiza C, Cerbón MA, Morimoto S, Camacho-Arroyo I. Progesterone receptor isoforms expression pattern in the rat brain during the estrous cycle. *Life Sci* 2000; **66**:1743–1752.
- Guerra-Araiza C, Villamar-Cruz O, González-Arenas A, Chavira R, Camacho-Arroyo I. Changes in progesterone receptor isoforms content in the rat brain during the oestrous cycle and after oestradiol and progesterone treatments. *J Neuroendocrinol* 2003; **15**:984–990.
- Mani S. Progesterone receptor subtypes in the brain: the known and the unknown. *Endocrinology* 2008; **149**:2750–2756.
- Bennett AL, Blasberg ME, Blaustein JD. Mating stimulation required for mating-induced estrous abbreviation in female rats: effects of repeated testing. *Horm Behav* 2002; **42**:206–211.
- Auger AP, Moffatt CA, Blaustein JD. Progesterone-independent activation of rat brain progesterone receptors by reproductive stimuli. *Endocrinology* 1997; **138**:511–514.
- Auger AP, LaRiccica LM, Moffatt CA, Blaustein JD. Progesterone, but not progesterone-independent activation of progesterone receptors by a mating stimulus, rapidly decreases progesterone receptor immunoreactivity in female rat brain. *Horm Behav* 2000; **37**:135–144.
- Paxinos G, Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Sydney: Academia Press; 1986.
- Abraham GE. Radioimmunoassays of steroids in biological fluids. *J Steroid Biochem* 1975; **6**:261–270.
- Camacho-Arroyo I, Villamar-Cruz O, González-Arenas A, Guerra-Araiza C. Participation of the 26S proteasome in the regulation of progesterone receptor concentration in the rat brain. *Neuroendocrinology* 2002; **76**:267–271.
- González-Flores O, Guerra-Araiza C, Cerbón MA, Camacho-Arroyo I, Etgen AM. The 26S proteasome participates in the sequential inhibition of estrous behavior induced by progesterone in rats. *Endocrinology* 2004; **145**:2328–2336.
- Guerra-Araiza C, Gómora-Arrati P, García-Juárez M, Armengual-Villegas A, Miranda-Martínez A, Lima-Hernández FJ, et al. Role of progesterone receptor isoforms in female sexual behavior induced by progestins in rats. *Neuroendocrinology* 2009; **90**:73–81.
- Auger AP, Moffatt CA, Blaustein JD. Reproductively-relevant stimuli induce Fos-immunoreactivity within progesterone receptor-containing neurons in localized regions of female rat forebrain. *J Neuroendocrinol* 1996; **8**:831–838.

Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

ScienceDirect

[www.elsevier.com/locate/brainres](http://www.elsevier.com/locate/brainres)

Brain Research



## Research Report

# Differential DNA methylation pattern in the A and B promoters of the progesterone receptor is associated with differential mRNA expression in the female rat hypothalamus during proestrus



Luciano Mendoza-Garcés<sup>a,\*</sup>, Mauricio Rodríguez-Dorantes<sup>b</sup>,  
 Carolina Álvarez-Delgado<sup>a</sup>, Edgar Ricardo Vázquez-Martínez<sup>a</sup>,  
 Pilar García-Tobilla<sup>b</sup>, Marco A. Cerbón<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Facultad de Química, Departamento de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Coyoacán, México, D.F., México

<sup>b</sup>Instituto Nacional de Medicina Genómica, Periférico Sur 4809 Arenal Tepepan, Tlalpan, 14610 México, D.F., México

## ARTICLE INFO

## Article history:

Accepted 21 August 2013

Available online 27 August 2013

## Keywords:

Progesterone receptor

Hypothalamus

Transient DNA methylation

## ABSTRACT

In rodents, the display of reproductive behavior occurs during the proestrus–estrus transition of the estrus cycle. This behavior is regulated by estradiol and progesterone mainly via their intracellular receptors. Two isoforms of the progesterone receptor have been described (A and B), and they have different promoters for their regulation. It has been demonstrated that the mRNA for both isoforms changes during the proestrus–estrus transition. It has been recently established that DNA methylation can be transient and cyclical in gene promoters, however, these changes have only been reported *in vitro* but not in physiological models. The aim of this study was to analyze the pattern of DNA methylation in the PR (A and B) promoter regions during the proestrus–estrus transition in the rat hypothalamus and its correlation with the regulation of mRNA expression. The results demonstrated a differential mRNA expression of the progesterone receptor (A and B) isoforms. The expression of total PR did not change significantly during the proestrus day, while the expression of isoform B increased significantly at 17:00 h, followed by a significant decrease at 21:00 h of the proestrus day. Interestingly, we also found that the isoform A promoter was mainly unmethylated at all studied time points. In contrast, the isoform B promoter showed a transient methylation increase during the evening of proestrus. The overall results indicate that there is a switch of progesterone receptor isoforms expression during the evening of proestrus that is related to the differential gene methylation patterns of their promoter regions, mainly for the isoform B promoter.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

\*Corresponding author. Present address: Instituto Nacional de Geriatria Periférico Sur 2767 San Jerónimo Lídice, Magdalena Contreras, 10200 México, D.F., México.

E-mail address: [lumega5@hotmail.com](mailto:lumega5@hotmail.com) (L. Mendoza-Garcés).

## 1. Introduction

In rodents, the display of reproductive behavior occurs during the proestrus–estrus transition of the estrus cycle, and this behavior depends mainly on the effects of estradiol ( $E_2$ ) and progesterone ( $P_4$ ) (Edwards and Pfeifle, 1983). The effects exerted on reproductive behavior by these hormones are mediated by their intracellular receptors. These intracellular receptors work as nuclear transcription factors by regulating gene expression and genomic networks (O'Malley, 1990).

Two isoforms of the progesterone receptor (PR), known as PR-A (86 KDa) and PR-B (110 KDa), have been described. Both isoforms are encoded by the same gene, but are regulated by two different promoters with their respective transcription start sites (Kastner et al., 1990). It has been reported that the pattern of protein expression of the PR isoforms changes during the proestrus–estrus transition in rat hypothalamus. Specifically, the PR-A protein content increases, while PR-B decreases significantly during the deployment of reproductive behavior (Mendoza-Garcés et al., 2010). In addition, it has been demonstrated that the mRNA for both PR isoforms also changes during this period. PR-B mRNA reaches its greatest expression at 17:00 h of proestrus and then declines; while the total PR mRNA does not change during the transition (Liu and Arbogast, 2009). These data show that there is a transient and differential expression of PR isoforms, indicating a regulation at the transcriptional level.

The PR gene contains CpG islands in the 5' upstream region of the promoter (Kastner et al., 1990). CpG islands are areas rich in CG dinucleotides that are within the promoter region of several genes (Gardiner-Garden and Frommer, 1987). *De novo* methylation and hypermethylation of CpG islands in the promoter have been linked to gene silencing (Issa et al., 1996). Interestingly, an association between PR gene methylation and expression silencing has been demonstrated in different tumors from reproductive tissues.

Other authors have reported that in promoters with few or absence of CpG islands some particular CpG dinucleotides may participate as regulatory elements of gene expression (Han et al., 2011; Hartung et al., 2012).

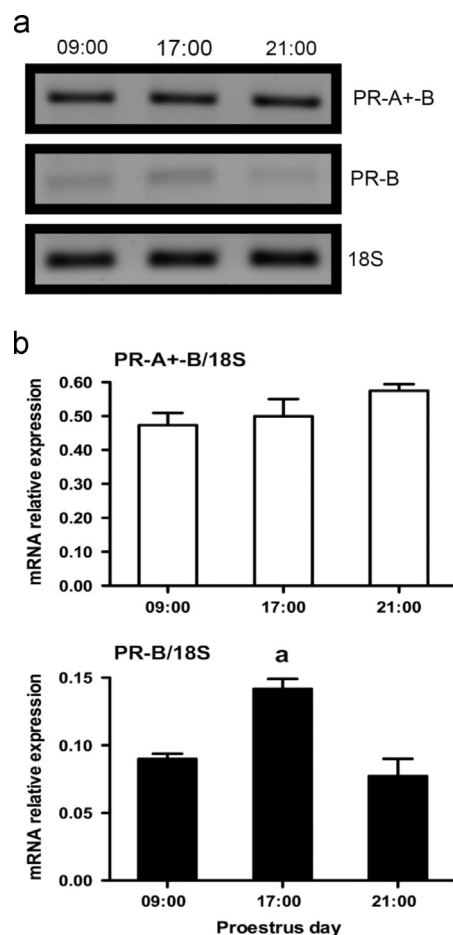
DNA methylation has been described as a stable and heritable process. However, in a series of pioneering experiments, Kangaspeska et al. have described a mechanism of cyclic methylation and demethylation in CpG dinucleotides of gene promoters that encode pS2 (also known as TFF1 Trefoil Factor 1), thus demonstrating that methylation can in fact be a dynamic process (Kangaspeska et al., 2008). Additionally, the expression of estrogen receptor  $\alpha$  ( $ER\alpha$ ) changes according to different methylation modifications; both pS2 and  $ER\alpha$  genes respond to estrogens, and display epigenetic regulation (Wilson et al., 2008). It is unknown if these mechanisms can be involved in the dynamic regulation of PR isoforms during various physiological processes, such as neuroprotection, sexual behavior, maternal behavior, and multiple functions which have been described in the Central Nervous System (CNS). In addition, there is no information about the methylation pattern of CpG sites in the A and B promoter regions of the PR gene in the rat hypothalamus during the proestrus–estrus transition, in which there is a display of sexual

behavior. The aim of this study was to analyze the DNA methylation pattern of PR isoforms promoters during the proestrus–estrus transition in the hypothalamus, and its correlation with the regulation of mRNA expression.

## 2. Results

We evaluated the transcriptional regulation of PR gene isoforms during the proestrus day by amplification of the corresponding PCR products (Fig. 1a). We observed that total PR did not change significantly during all studied time points (Fig. 1b). Interestingly, a significantly higher expression of the PR-B isoform was observed at 17:00 h compared with a lower expression at 09:00 and 21:00 h of proestrus.

The hormonal levels during the proestrus day are depicted in Table 1; all hormonal levels were consistent with those expected for a proestrus–estrus transition. Our results demonstrate that at 17:00 h of proestrus both hormones are at their



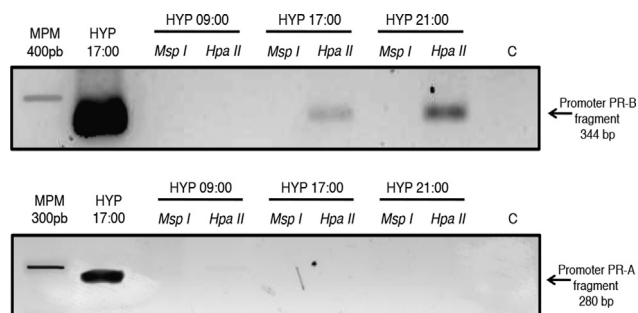
**Fig. 1** – PR isoforms expression pattern during the proestrus–estrus transition. (a) RT-PCR representative image for mRNA PR isoforms and 18S at 09:00, 17:00 and 21:00 h of the proestrus–estrus transition in the rat hypothalamus. (b) Analysis of the PR isoforms expression intensity in the three time points studied. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM ( $n=5$ ), a  $p < 0.05$  compared with 09:00 and 21:00 h. Animals were maintained in a 14:10 h light/dark cycle (lights on 06:00 h).



**Table 1 – P<sub>4</sub> and E<sub>2</sub> Serum levels during proestrus–estrus transition in female rats.**

Hour	E <sub>2</sub> (pg/ml)	P <sub>4</sub> (ng/ml)
09:00	34.37 ± 7.17	19.32 ± 4.28
17:00	64.88 ± 5.48 <sup>a</sup>	54.30 ± 11.33 <sup>b</sup>
21:00	24.77 ± 8.24	47.45 ± 8.00

Results are mean ± SEM (n=5),  
<sup>a</sup> p < 0.05 compared with 09:00 and 21:00.  
<sup>b</sup> p < 0.05 compared with 09:00.



**Fig. 2 – CCGG methylation sites in the PR promoter region of rat hypothalamus in the proestrus–estrus transition. Representative image of a PCR with DNA digested by CpG methylation sensitive (*HpaII*) and non-sensitive (*MspI*) restriction enzymes. Undigested genomic DNA of rat hypothalamus (HYP) was used as control. C is PCR without DNA.**

highest serum concentrations. P<sub>4</sub> shows its lowest serum concentration at 09:00 h of proestrus while E<sub>2</sub> concentrations are lowest at 21:00 h of proestrus (Table 1).

We analyzed the PR gene promoter methylation pattern by CpG methylation sensitive and non-sensitive restriction enzymes. Digestion of total DNA was performed with the methylation-sensitive restriction enzyme *HpaII*, which does not cut hemi-methylated or methylated C<sup>5</sup>-MeCGG sequences. The promoter region contains *Hpa II* sensitive sites at +280, +295, +507, +552 and +725, relative to the PR-B promoter transcription start site (Kraus et al., 1993). We observed that at least one of the PR-A promoter sites (+507, +552 and +725) was not methylated; hence, we did not obtain an amplification band after performing the PCR (Fig. 2). On the other hand, we observed that sites +280 and +295 showed transient methylation, since at 17:00 and 21:00 h of proestrus an amplification band was detected, but it was absent at 09:00 h. Interestingly, we observed a lower band intensity at 17:00 h than at 21:00 h, which suggests that there is an increase in the methylation process in the evening of proestrus.

To confirm the methylation status during the proestrus day, we used the bisulfite sequencing primers method (BSP), in which the PCR products were cloned for further sequencing. The results demonstrate that the A promoter region was almost completely unmethylated. Interestingly, CpG sites within the B promoter presented an increase in methylation during the

transition hours of proestrus, as it is depicted in Fig. 3, thus demonstrating a transient methylation of promoter B.

### 3. Discussion

Previous studies show the differential function of PR isoforms in several cultured cells and tissues. It has been demonstrated that PR isoforms interact with different coactivators and corepressors. In addition, the interaction between the coregulator and the PR isoform can be ligand-dependent and -independent (Gao and Nawaz, 2002; Scarpin et al., 2009). Interestingly, while both of the isoforms were essential for SKF-facilitated sexual behavior, PR-A appeared to play a more important role in the 8-bromo-cAMP-facilitated lordosis response, raising the possibility of distinct intracellular signaling pathways mediating the responses (Mani et al., 2006). The previous data open the possibility of modulating cell- and/or tissue-specific responses to progesterone through differential expression PR isoforms. However, the evidence supporting the differential regulation of PR-A and PR-B isoform expression is still scarce.

In this work we provide evidence that there is a transient DNA methylation in the PR-B gene promoter region during the proestrus day in the rat hypothalamus. In addition, we found changes in PR isoform expression during this period of time. Indeed, in the three studied time points of the proestrus day the isoform A mRNA is more abundant than isoform B mRNA. The difference in the expression of isoform B is statistically significant at 17:00 h of proestrus compared to 09:00 and 21:00 h. These results are in line with previous reports that showed variations in mRNA PR isoforms during the proestrus-estrus transition (Liu and Arbogast, 2009). Our results confirm and explain in more detail the differential and specific regulation of PR isoforms at the transcriptional level during this physiological condition.

In this work we performed a series of experiments in order to demonstrate that there is a specific methylation pattern of the PR-B and -A promoter regions in the rat hypothalamus. For this aim, we analyzed the methylation pattern at CpG sites during the proestrus day. There are 21 CpG sites in the PR-A promoter region; most of them are unmethylated at all the studied time points of the proestrus day. Indeed, only +650 and +693 sites are methylated at 21:00 h (Fig. 3). The results presented here are consistent with the idea that there is a relation between an unmethylated promoter and mRNA expression of the gene.

In contrast to PR-A, the PR-B promoter showed a differential methylation pattern during the evening of proestrus. The methylation of 9 CpG sites within the B promoter increased in the course of the evening of proestrus, as shown in Fig. 3. These results correlate well with the changes observed in the mRNA expression level of the PR-B isoform. On the other hand, up-regulation of both isoforms in response to E<sub>2</sub> stimulation has been described, although the two promoters did not contain classical Estrogen Response Elements (ERE). Furthermore, in HeLa cells the treatment with E<sub>2</sub> induced and increased PR-B promoter activity five-fold via ER $\alpha$ , but not by ER $\beta$  (Flotto et al., 2004). It has been reported that estrogens up-regulate expression of the ER $\alpha$  gene in most

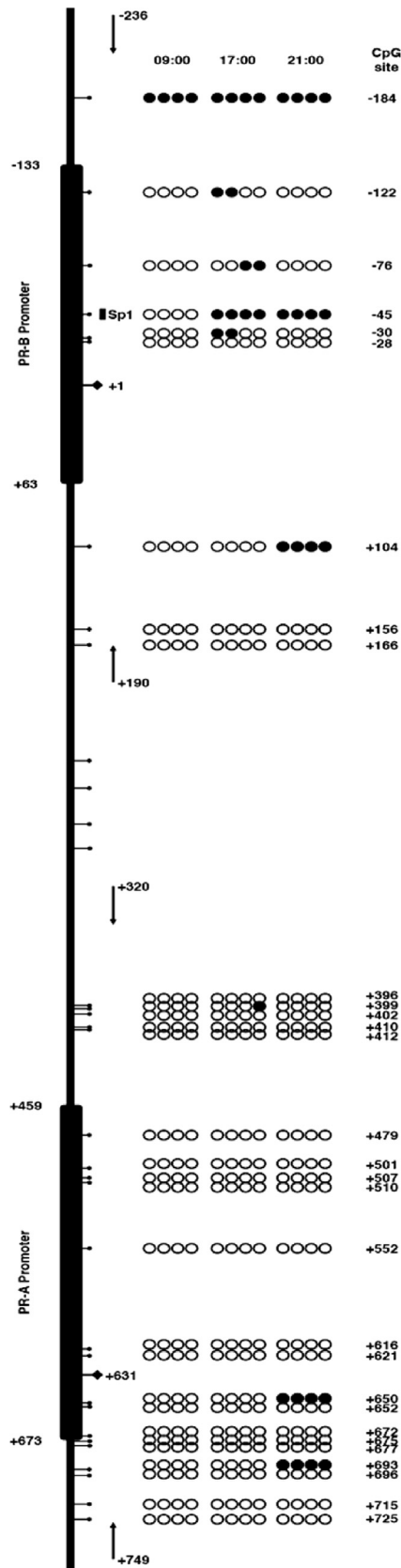
mammalian tissues (Robertson et al., 2002). In the present study  $E_2$  concentration was lower at 09:00 h than at 17:00 h in evening of proestrus. These data correlated well with the low

expression of PR-B in the morning of proestrus (09:00 h). In contrast, when estradiol levels were increased during the evening of proestrus, its expression was significantly increased before the promoter became significantly methylated (Fig. 1). A further decrease in estradiol concentration in the evening of proestrus and methylation of the PR-B promoter correlate well with the decrease in PR-B mRNA levels (as shown in Figs. 1 and 3).

Recently, it has been demonstrated that 5-azacytidine administration is followed by an increase in PR-B isoform expression, without changes in the expression of the PR-A isoform (Hansberg-Pastor et al., 2013). In line with this, it has been previously reported that gene promoter demethylation using demethylation agents restores protein expression in different cancer cell lines (Zhang et al., 2011). Various studies have demonstrated the correlation between the expression of the PR-B isoform and promoter methylation changes in different pathophysiological conditions. Specifically, hypermethylation of PR-B has been demonstrated in breast cancer, endometriosis, and endometrial tumors as well as in cultured cells *in vitro*, with a concomitant reduction of PR-B expression (Gaudet et al., 2009; Jichan et al., 2010; Lee et al., 2009; Liu et al., 2004).

Furthermore, recent reports on genome analysis indicate that the methylation pattern on CpG sites in the PR-A and -B promoter regions during development is modified. According to ours and other reports, these changes occur mainly in the B promoter region (Mitchell et al., 2013), thus indicating that changes in the methylation patterns of the PR promoter region may play an important role in the switch of PR isoforms expression in different types of cells and physiological conditions.

It has been reported that the -45 CpG site (Fig. 3) is part of a recognition sequence of the Sp1 transcription factor in the PR-B promoter region (Kraus et al., 1993). Interestingly, in electrophoretic mobility shift assay experiments for Sp1 interactions, it has been demonstrated that methylation within the consensus Sp1 binding site did not reduce Sp1/Sp3 binding, whereas methylation outside the consensus binding site induced a significant decrease in Sp1/Sp3 binding and further regulated gene expression. This observation is similar to our finding of an increasing methylation process at the CpGs close to the Sp1 site in the PR-B region (Fig. 3); and correlates well with our observation of a subsequent decrease



**Fig. 3 – Methylation pattern of PR gene promoters. Schematic representation of PR isoforms promoters. Thick bars on the main line represent the reported promoter length. +1 and +631 are the isoform B and isoform A transcription start sites respectively; arrows represent primers that were used in the amplification of the fragments for the methylation analysis of CpG sites. Representation of methylation state of CpG sites at different times of the proestrus-estrus transition, each column of circles represents 5 clones of an animal, 4 animals were evaluated at each time point studied; black circles correspond to methylated CpG sites; the numeral in the rows of circles correspond to (CpG sites) with respect to the transcription start site of isoform B. ■ is Sp1 binding site.**

in PR-B expression, which is in agreement with a previous report by Liu and Arbogast (Liu and Arbogast, 2009). The persistent methylation observed at the CpG site upstream of the Sp1 site in the PR promoter seems to be a landmark methylation location of Sp1, because during the proestrus phase an increased methylation in the contiguous CpG site becomes apparent, as it can be observed in Fig. 3. This observation suggests that there is an inactivation of this transcription factor as it has been previously described (Li et al., 2004).

To our knowledge, this is the first report regarding the differential methylation pattern of the PR gene promoter region in a physiological condition. These results support and extend previous observations of transient methylation patterns in the promoter regions of estrogen regulated genes related to transcriptional gene expression (Kangaspeska et al., 2008).

In conclusion, the overall results suggest that there is a switch of PR isoforms expression during the evening of proestrus, which is related to the differential gene methylation patterns of their promoter regions, mainly for the PR-B promoter.

## 4. Experimental procedures

### 4.1. Animals

All animals were maintained and handled in accordance with the Guidelines of the Mexican Law of Animal Protection (NOM-062-ZOO-1999). Rats were purchased from the UNAM-Harlan Center. Adult female Wistar rats (200–250 g) were maintained under a 14:10 h light/dark cycle (lights on 06:00 h), with food and water available *ad libitum*. Two month-old female rats were used. Their estrus cycle was monitored by daily vaginal smears and only those rats that had at least 4 continuous 4-day estrus cycles were included in the experiments. Rats in the proestrus-estrus transition were selected and killed at 09:00, 17:00 and 21:00 h of proestrus. All rats were killed by decapitation, the brain was obtained and the hypothalamus was dissected according to the Atlas of Paxinos and Watson (Paxinos et al., 1980). The hypothalamus was defined as a block of tissue bounded rostrally by the optic chiasma, caudally by the mammillary body, laterally by the hypothalamic sulci and dorsally by a cut 5 mm deep, commonly known as the Medial Basal Hypothalamus (MBH). The MBH fragment included the arcuate nucleus, periventricular nucleus, part of the ventromedial hypothalamus, as well as the median eminence (Liu and Arbogast, 2009).

### 4.2. Rt-PCR

Total RNA was extracted using the AllPrep DNA/RNA Mini Kit (QIAGEN<sup>®</sup>, MD, USA) and was stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  for further analysis. Total RNA concentration was determined by absorbance at 260 nm using NanoDrop<sup>™</sup> 2000 (Thermo Fisher Scientific<sup>®</sup>, MA, USA) and integrity was verified by a denaturant 1% agarose gel electrophoresis in the presence of 2.2 M formaldehyde. Total RNA was converted to cDNA by M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen<sup>®</sup>, NY, USA). A reaction

volume of RT, which corresponded to 100 ng of cDNA, was taken to make endpoint PCR to amplify PR isoforms and 18S ribosomal RNA was used as a loading control. The primers used to amplify the fragment of PR-B (243 bp) were 5'-[ACT GAG CTG CAG GCA AAG]-3' for the sense primer and 5'-[GGC ACA GCG ACT GCT GA]-3' for the antisense primer. Primers used to amplify the fragment that is common to PR-A and PR-B (292 bp) were 5'-[CTC CTG GAT GAG CCT GAT G]-3' (sense) and 5'-[CCC GAA TAT AGC TTG ACC TC]-3' (antisense). Primers used to amplify the 18S gene were 5'-[AAA CGG CTA CCA CAT CCA AG]-3' (sense) and 5'-[CCT CCA ATG GAT CCT CGT TA]-3' (antisense). The 25  $\mu\text{l}$  PCR reaction had: 100 ng of cDNA, 20 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.2 mM for each dNTP, 0.5  $\mu\text{M}$  for each primer and 2.5 units of Taq DNA polymerase. Negative controls without cDNA and reaction of RT without RNA were included in all experiments. After the initial denaturation step at  $94^{\circ}\text{C}$  for 5 min, the PCR was performed for 25 cycles. Cycle profile for the amplification of PR and 18S genes was:  $94^{\circ}\text{C}$ , 30 s;  $60^{\circ}\text{C}$ , 30 s; and  $72^{\circ}\text{C}$ , 1 min. A final extension was performed for 5 min at  $72^{\circ}\text{C}$ . PCR products were separated in a 2% agarose gel and were detected with ethidium bromide. The image was obtained and analyzed using VisionWorksLS Image Acquisition and Analysis Software 6.7.2 (UVP<sup>®</sup>, CA, USA). The intensity of the PR or 18S bands was quantified by densitometry using VisionWorksLS (UVP<sup>®</sup>, CA, USA). Expression levels of PR isoforms were normalized with 18S. PR-A+B and PR-B relative expression was calculated by dividing the signal intensity of the PR-A+B or PR-B segment between the signal intensity of the amplification segment of 18S.

### 4.3. Methylation-sensitive enzyme digestion

Extracted DNA was digested with endonucleases. Restriction enzymes used were *MspI* and *HpaII* (New England Biolabs<sup>®</sup> Inc., MA, USA), both enzymes cut at CCGG sequences and only *HpaII* is sensitive to methylation (it does not cut methylated sequences:  $\text{C}^5\text{-MeCGG}$ ). Digestion was performed according to the manufacturer's instructions. The reaction of 15  $\mu\text{l}$  was: 200 ng of DNA, 1.5  $\mu\text{l}$  of buffer and 1  $\mu\text{l}$  of enzyme. The thermocycler reaction was performed at  $37^{\circ}\text{C}$  for 3 h, then at  $70^{\circ}\text{C}$  for 20 min. Subsequently, 2  $\mu\text{l}$  of digested products were used to amplify the respective fragments of PR promoters containing CCGG sequences. Primer sequences used to amplify the PR-B promoter fragment (344 bp) were 5'-[GCG GGC CTT CST AGA GCG]-3' (sense) and 5'-[GCC GTG CTG AAG CAG GCC]-3' (antisense). The primers to amplify the PR-A promoter fragment (280 bp) had the following sequences: 5'-[GGA GAT CCC ACG GGT CCG]-3' (sense) and 5'-[ACT ACA GAC GAT GCG TCC G]-3' (antisense). 2  $\mu\text{l}$  of digested DNA, 20 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.2 mM of each dNTP, 0.5  $\mu\text{M}$  of each primer and 2.5 units of Taq DNA polymerase were taken to a final volume of 25  $\mu\text{l}$  of PCR mix. Negative controls without DNA and with undigested DNA were included in all experiments. After the initial denaturation step at  $94^{\circ}\text{C}$  for 5 min, the PCR was performed for 30 cycles; the cycle profile for PR-B promoter fragment amplification was:  $94^{\circ}\text{C}$ , 30 s;  $61^{\circ}\text{C}$ , 30 s; and  $72^{\circ}\text{C}$ , 1 min. The cycle profile for PR-A promoter fragment amplification was:  $94^{\circ}\text{C}$ , 30 s;  $55^{\circ}\text{C}$ , 30 s; and  $72^{\circ}\text{C}$ , 1 min. The final extension

was performed at 72 °C for 5 min. PCR products were separated in a 2% agarose gel, detected with ethidium bromide and analyzed as described in Section 4.2.

#### 4.4. Bisulfite sequencing PCR (BSP)

DNA was extracted with the AllPrep DNA/RNA Mini Kit (QIAGEN<sup>®</sup>, MD, USA) and treated with bisulfite with the EZ DNA MethylationTM kit (ZYMO<sup>®</sup> Research Corp, CA, USA) for bisulfite sequencing PCR (BSP). The sequences of the PR-B promoter primers (427 bp) were 5'-[TTG AAG TTT TTA TAA AAA TTT TGT TT]-3' (sense) and 5'-[AAA CCC TAA AAC TAA AAA ATA ACC C]-3' (antisense). PR-A promoter primers (430 bp) used were 5'-[GGG TAA AAG TTT TTT GAA AAT TTG TT]-3' (sense) and 5'-[ATA CTA ACT TCC CTA AAA AAA ATC C]-3' (antisense). The PCR mix (50 µl) was: 2 µl of DNA treated with bisulfite, 20 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM of each dNTP, 0.5 µM of each primer, and 2.5 units of Taq DNA polymerase. After the initial denaturation step at 95 °C for 5 min, the PCR was performed for 40 cycles. The cycle profile for the amplification of the PR promoters was: 95 °C, 30 s; 59 °C, 30 s; and 72 °C, 1 min. The final extension of the cycle was performed at 72 °C for 5 min. PCR products were separated in a 1% agarose gel and were detected with ethidium bromide. The QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN<sup>®</sup>, MD, USA) was used to obtain PCR products dissolved in water, the samples were then quantified by NanoDropTM 2000 (Thermo Fisher Scientific<sup>®</sup>, MA, USA). The pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector System (Promega Corp.<sup>®</sup> WI, USA) was used for cloning the PCR products. Following the cloning of the PCR products, the Zyppy<sup>™</sup> Plasmid Miniprep Kit (ZYMO<sup>®</sup> Research Corp, CA, USA) was used for the purification of the plasmid. The obtained samples were sequenced in the Applied Biosystems Sequencing and Genotyping Unit (Life Technologies<sup>™</sup> Corp. CA, USA) at INMEGEN.

#### 4.5. Radioimmunoassay (RIA)

E<sub>2</sub> and P<sub>4</sub> levels were measured by radioimmunoassay. Specific double antibody radioimmunoassay was performed in independent serum samples from groups of four rats for each experimental condition. All samples were stored at -70 °C until analyzed. E<sub>2</sub> and P<sub>4</sub> quantification was performed as previously described (Abraham, 1975), using the solid-phase <sup>125</sup>I technique, with the Coat-A-Count kit (Diagnostic Products Corporation<sup>®</sup>, CA, USA), following the method described by the manufacturer. The sensitivity of the assays was 5.4 pg/ml for E<sub>2</sub> and 8.3 ng/ml for P<sub>4</sub>. The intra-assay and inter-assay coefficients of variation were of 5.3 and 8%, respectively for E<sub>2</sub>, and 6.5 and 10%, respectively for P<sub>4</sub>.

#### 4.6. Statistical analysis

Values were expressed as mean ± SEM. For the analysis of mRNA expression and the analysis of hormone serum concentrations, statistically significant differences ( $P < 0.05$ ) were calculated using a 1-way ANOVA and a post hoc Tukey's test. All statistical analyses were performed using Prism 4 for Macintosh (GraphPad<sup>®</sup> Software, Inc.).

## Acknowledgments

This work was supported by grants from the National Council for Science and Technology (CONACyT) and PAPIIT and PAIP from National Autonomous University of Mexico. Luciano Mendoza-Garcés received a scholarship from CONACyT (#130644, period 2008–2012).

## REFERENCES

- Abraham, G.E., 1975. Radioimmunoassay of steroids in biological fluids. *J. Steroid Biochem.* 6, 261–270.
- Edwards, D.A., Pfeifle, J.K., 1983. Hormonal control of receptivity, proceptivity and sexual motivation. *Physiol. Behav.* 30, 437–443.
- Flotto, T., Niederacher, D., Hohmann, D., Heimerzheim, T., Dall, P., Djahansouzi, S., Bender, H.G., Hanstein, B., 2004. Molecular mechanism of estrogen receptor (ER)α-specific, estradiol-dependent expression of the progesterone receptor (PR) B-isoform. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 88, 131–142.
- Gao, X., Nawaz, Z., 2002. Progesterone receptors - animal models and cell signaling in breast cancer: role of steroid receptor coactivators and corepressors of progesterone receptors in breast cancer. *Breast Cancer Res.* 4, 182–186.
- Gardiner-Garden, M., Frommer, M., 1987. CpG islands in vertebrate genomes. *J. Mol. Biol.* 196, 261–282.
- Gaudet, M.M., Campan, M., Figueroa, J.D., Yang, X.R., Lissowska, J., Peplonska, B., Brinton, L.A., Rimm, D.L., Laird, P.W., Garcia-Closas, M., Sherman, M.E., 2009. DNA hypermethylation of ESR1 and PGR in breast cancer: pathologic and epidemiologic associations. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 18, 3036–3043.
- Han, H., Cortez, C.C., Yang, X., Nichols, P.W., Jones, P.A., Liang, G., 2011. DNA methylation directly silences genes with non-CpG island promoters and establishes a nucleosome occupied promoter. *Hum. Mol. Genet.* 20, 4299–4310.
- Hansberg-Pastor, V., Gonzalez-Arenas, A., Pena-Ortiz, M.A., Garcia-Gomez, E., Rodriguez-Dorantes, M., Camacho-Arroyo, I., 2013. The role of DNA methylation and histone acetylation in the regulation of progesterone receptor isoforms expression in human astrocytoma cell lines. *Steroids* 78, 500–507.
- Hartung, T., Zhang, L., Kanwar, R., Khrebtukova, I., Reinhardt, M., Wang, C., Therneau, T.M., Banck, M.S., Schroth, G.P., Beutler, A.S., 2012. Diametrically opposite methylome-transcriptome relationships in high- and low-CpG promoter genes in postmitotic neural rat tissue. *Epigenetics* 7, 421–428.
- Issa, J.P., Baylin, S.B., Belinsky, S.A., 1996. Methylation of the estrogen receptor CpG island in lung tumors is related to the specific type of carcinogen exposure. *Cancer Res.* 56, 3655–3658.
- Jichan, N., Xishi, L., Guo, S.W., 2010. Promoter hypermethylation of progesterone receptor isoform B (PR-B) in adenomyosis and its rectification by a histone deacetylase inhibitor and a demethylation agent. *Reprod. Sci.* 17, 995–1005.
- Kangaspeka, S., Stride, B., Metivier, R., Polycarpou-Schwarz, M., Ibberson, D., Carmouche, R.P., Benes, V., Gannon, F., Reid, G., 2008. Transient cyclical methylation of promoter DNA. *Nature* 452, 112–115.
- Kastner, P., Krust, A., Turcotte, B., Stropp, U., Tora, L., Gronemeyer, H., Chambon, P., 1990. Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B. *EMBO J.* 9, 1603–1614.
- Kraus, W.L., Montano, M.M., Katzenellenbogen, B.S., 1993. Cloning of the rat progesterone receptor gene 5'-region and identification of two functionally distinct promoters. *Mol. Endocrinol.* 7, 1603–1616.

- Lee, B., Du, H., Taylor, H.S., 2009. Experimental murine endometriosis induces DNA methylation and altered gene expression in eutopic endometrium. *Biol. Reprod.* 80, 79–85.
- Li, L., He, S., Sun, J.M., Davie, J.R., 2004. Gene regulation by Sp1 and Sp3. *Biochem. Cell Biol.* 82, 460–471.
- Liu, B., Arbogast, L.A., 2009. Gene expression profiles of intracellular and membrane progesterone receptor isoforms in the mediobasal hypothalamus during pro-oestrus. *J Neuroendocrinol.* 21, 993–1000.
- Liu, Z.J., Zhang, X.B., Zhang, Y., Yang, X., 2004. Progesterone receptor gene inactivation and CpG island hypermethylation in human leukemia cancer cells. *FEBS Lett.* 567, 327–332.
- Mani, S.K., Reyna, A.M., Chen, J.Z., Mulac-Jericevic, B., Conneely, O.M., 2006. Differential response of progesterone receptor isoforms in hormone-dependent and -independent facilitation of female sexual receptivity. *Mol. Endocrinol.* 20, 1322–1332.
- Mendoza-Garcés, L., Camacho-Arroyo, I., Cerbon, M.A., 2010. Effects of mating on progesterone receptor isoforms in rat hypothalamus. *Neuroreport* 21, 513–516.
- Mitchell, C.M., Sykes, S.D., Pan, X., Pringle, K.G., Lumbers, E.R., Hirst, J.J., Zakar, T., 2013. Inflammatory and steroid receptor gene methylation in the human amnion and decidua. *J. Mol. Endocrinol.* 50, 267–277.
- O'Malley, B., 1990. The steroid receptor superfamily: more excitement predicted for the future. *Mol. Endocrinol.* 4, 363–369.
- Paxinos, G., Watson, C.R., Emson, P.C., 1980. AChE-stained horizontal sections of the rat brain in stereotaxic coordinates. *J. Neurosci. Methods.* 3, 129–149.
- Robertson, J.A., Farnell, Y., Lindahl, L.S., Ing, N.H., 2002. Estradiol up-regulates estrogen receptor messenger ribonucleic acid in endometrial carcinoma (Ishikawa) cells by stabilizing the message. *J. Mol. Endocrinol.* 29, 125–135.
- Scarpin, K.M., Graham, J.D., Mote, P.A., Clarke, C.L., 2009. Progesterone action in human tissues: regulation by progesterone receptor (PR) isoform expression, nuclear positioning and coregulator expression. *Nucl. Recept. Signal* 7, e009.
- Wilson, M.E., Westberry, J.M., Prewitt, A.K., 2008. Dynamic regulation of estrogen receptor- $\alpha$  gene expression in the brain: a role for promoter methylation? *Front Neuroendocrinol.* 29, 375–385.
- Zhang, W., Wang, L., Fan, Q., Wu, X., Wang, F., Wang, R., Ma, Z., Yang, J., Lu, S.H., 2011. Arsenic trioxide re-sensitizes ER $\alpha$ -negative breast cancer cells to endocrine therapy by restoring ER $\alpha$  expression in vitro and in vivo. *Oncol Rep.* 26, 621–628.