



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO

UNAM  
POSGRADO

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y  
DOCTORADO  
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

REGULACIÓN DEL  
CONTENIDO DEL RECEPTOR A  
PROGESTERONA POR ESTRADIOL,  
PROGESTERONA Y LAS  
FOSFATASAS PP1 Y PP2A EN  
CÉLULAS DE ASTROCITOMA  
HUMANO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

:

MAESTRA EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)

P R E S E N T A

:

BIÓL. EXP. EDITH ARACELI  
CABRERA MUÑOZ

Tutor: DR. IGNACIO CAMACHO ARROYO





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.

MÉXICO, D. F.

2007

### **Agradecimientos**

Esta tesis fue realizada gracias al apoyo económico de CONACYT (Proyecto 43224).

Este trabajo se realizó bajo la dirección del Dr. Ignacio Camacho Arroyo en el Departamento de Biología de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El comité tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dr. Ignacio Camacho Arroyo

Dra. María Eugenia Torres Márquez

Dr. Julio Eduardo Roque Morán Andrade

El jurado de Examen de Maestría estuvo constituido por:

Presidente: Dra. Marta Menjivar Iraheta

Vocal: Dr. Francisco Javier Placencia de la Parra

Secretario: Dra. Ma. Eugenia Torres Márquez

Suplente: Dra. Ma. de Lourdes Massieu Trigo

Suplente: Dra. Marina Macías Silva

Para mis padres Xochitl y Rigoberto por ser mi pilar de fuerza, a Rigo por plantarme los pies en la tierra y a mi chiquita Judith por ser fuente de inspiración para seguir cada día, a todos ustedes gracias ya que sin su apoyo y cariño no habría llegado hasta aquí ni a ser lo que soy. Gracias por creer en una loca que cambió el dinero por la satisfacción personal, con todo lo que ello implica.

Mario, gracias por acompañarme en este camino y por compartir un trozo de tu vida conmigo.

Tete, gracias por tu gran amistad y por tantas premieres a las que hemos ido, y por las que nos faltan, en nuestros ratos libres ¡Viva Buda! A Tania por que sin sus rabetas y su fe no sería lo mismo.

A los chavos del ahora laboratorio 107 que han hecho mi estancia en la UNAM más que agradable: Aliesha, Fabian, Gaby, Iván, Mariana (berrinches), Milena, Olga y a la Sra. Geno pues sin ella el laboratorio estaría de cabeza; a los vecinos Caro, Ely, Luciano y Mauricio y en especial al Dr. War por enseñarme lo que se hace en el laboratorio, incluyendo los desayunos.

Agradezco al Dr. Ignacio Camacho Arroyo por guiarme y enseñarme durante este tiempo, por sus críticas y consejos que me han iniciado en este interesante e inagotable quehacer. Gracias Nacho por ser tan rudo.

Gracias Dra. Ma. Eugenia Torres por sus observaciones a este proyecto y por las charlas extracurriculares.

A mis maestros que me formaron y encausaron hacia este lugar, Hortensia y Dr. Salame.

La gente primero niega una cosa;  
luego la minimiza;  
luego decide que ya se sabía  
desde hacía tiempo

Alexander von Humboldt  
(1769-1859)

## Índice

|  |    |
|--|----|
| I. Abreviaturas  | i  |
| II. Resumen  | 1  |
| III. Introducción  | 2  |
| IV. Antecedentes   |    |
| 4.1. Estructura y función de la progesterona (P <sub>4</sub> ) | 3  |
| 4.1.1. Mecanismos de acción de la P <sub>4</sub>               | 6  |
| 4.2. Características del Receptor a P <sub>4</sub> (RP)        | 9  |
| 4.2.1. Isoformas del RP  | 11 |
| 4.2.2. RP y los tumores cerebrales                             | 14 |
| 4.2.3. Regulación de la expresión del RP                       | 17 |
| 4.2.3.1. Fosforilación del RP                                  | 20 |
| V. Planteamiento del problema                                  | 25 |
| VI. Hipótesis  | 26 |
| VII. Objetivos   | 26 |
| 7.1. Objetivo General  | 26 |
| 7.2. Objetivos Particulares                                    | 26 |
| VIII. Materiales y Métodos                                     | 27 |
| 8.1. Cultivo Celular   | 27 |
| 8.2. Extracción de Proteínas totales                           | 28 |
| 8.3. Western Blot  | 28 |
| 8.4. Análisis de Resultados                                    | 30 |
| IX. Resultados   | 31 |
| X. Discusión   | 36 |
| XI. Conclusiones   | 40 |
| XII. Referencias   | 41 |
| XIII. Apéndice   | 54 |

## INTRODUCCIÓN

### **I. Introducción**

La  $P_4$  regula diversas acciones en distintos tejidos. Muchas de las acciones de la  $P_4$  están mediadas por su receptor intracelular (RP), el cual es un factor de transcripción activado por su ligando que pertenece a la familia de los receptores a hormonas esteroideas, tiroideas, ácido retinoico y vitamina D. El RP tiene dos isoformas, una más larga denominada RP-B (120 kDa) y una troncada RP-A (94 kDa) con distinta función, regulación y localización (Tabla1) (Camacho–Arroyo, 2003).

| <b>TEJIDO</b>    | <b>FUNCIÓN</b>  |
|------------------|---|
| Útero/ovario     | *Liberación de ovocito.<br>*implantación<br>*Mantenimiento del embarazo |
| Glándula mamaria | *Desarrollo alveolar<br>*Regulación de síntesis de leche.               |
| Pulmón           | *Incremento de la ventilación en el ciclo menstrual y el embarazo       |
| Hueso            | *Regulación de la masa ósea   |

Tabla1. Función de la  $P_4$  en diversos tejidos blanco.

El RP se encuentra fosforilado basalmente y la interacción con la hormona y con los elementos de respuesta a progesterona ( $P_4$ ) de los genes activados por el RP aumenta la fosforilación. Ésta modifica la actividad transcripcional del RP y es una señal para que el receptor sea ubiquitinado y posteriormente degradado por el proteosoma 26S, por lo que una mayor fosforilación del RP induce una mayor degradación del mismo (Lange, 2004). Se desconoce el papel de las fosfatasa sobre el contenido del RP. Por lo que en este proyecto se estudió el efecto de la inhibición de las fosfatasa PP1 y PP2A sobre el contenido del RP en la línea celular de astrocitoma humano D54.



## II. Resumen

La progesterona ( $P_4$ ) participa en la regulación de diversas funciones celulares a través de la interacción con su receptor intracelular (RP). Este receptor ha sido detectado en diversos tumores cerebrales tales como los astrocitomas. En diferentes tipos celulares se ha observado que el RP es regulado de manera positiva por el estradiol ( $E_2$ ) y negativamente por la progesterona ( $P_4$ ). Por otro lado, la fosforilación y desfosforilación del RP esta mediada a través de las cinasas activadas por mitógenos (MAPK) y de las fosfatasas PP1 y PP2A, respectivamente. La fosforilación del RP se ha relacionado con su degradación por medio de la vía Ubiquitina-Proteosoma 26S. El papel del  $E_2$ ,  $P_4$  y las fosfatasas PP1 y PP2A en la regulación del contenido del RP en células de astrocitoma humano se desconoce. En el presente estudio se determinó el efecto del  $E_2$ , la  $P_4$  y la inhibición de las fosfatasas PP1 y PP2A con ácido okadaico, en la regulación del contenido del RP en la línea celular D54 correspondiente a un astrocitoma humano grado IV por medio de la técnica de Western blot. A diferencia de otras líneas celulares, el  $E_2$  no incrementó el contenido del RP, sino que lo redujo después de 12 horas del tratamiento y a 24 horas no mostró ningún efecto. Se observó una reducción en el contenido del RP con el tratamiento de  $P_4$  después de 12 y 24 horas. El tratamiento con ácido okadaico potenció la regulación negativa inducida por la  $P_4$ . Los resultados indican que el contenido del RP es regulado por hormonas esteroides y por las fosfatasas PP1 y PP2A en la línea celular de astrocitoma humano D54.

### III. Planteamiento del problema

En los astrocitomas se ha reportado una mayor expresión del RP en los grados más avanzados de estos tumores. Por otro lado, se sabe que en la mayoría de los tejidos sanos y cancerosos, la expresión del RP puede regularse positivamente por el E<sub>2</sub> a nivel del mRNA, y negativamente por P<sub>4</sub> a nivel de la proteína. Estudios *in vivo* e *in vitro* muestran que el RP es blanco de fosforilación y de posterior degradación por el sistema ubiquitina-proteosoma, en células T-47D y en células de la hipófisis y del SNC.

Se han identificado las fosfatasas que intervienen en la desfosforilación del RP (PP1 y PP2A). Se ha estudiado la acción de dichas fosfatasas en la regulación de la actividad transcripcional del RP, sin embargo se desconoce el papel que tienen éstas en la regulación del contenido del RP, es por ello que en este trabajo se determinó el efecto que tiene la inhibición de PP1 y PP2A en la regulación del contenido de este receptor en cultivos de células de astrocitoma humano grado IV (D54).

## VII. Materiales y Métodos

### 7.1. Cultivo celular.

Líneas celulares de astrocitoma (D54) y adenocarcinoma mamario (T47D), fueron cultivadas en medio DMEM-rojo fenol o RPMI- rojo fenol, respectivamente, suplementado con suero fetal bovino al 10% hasta obtener el 80% de confluencia (aproximadamente 1 semana). Una vez obtenida la confluencia se contaron las células en una cámara de Neubauer y se colocaron 500 000 células en medio DMEM o RPMI- rojo fenol durante 24 horas. Después de este tiempo se realizó un cambio por medio DMEM o RPMI sin rojo fenol suplementado con suero bovino fetal al 10% libre de hormonas durante 24 horas.

Para determinar los efectos del E<sub>2</sub> y P<sub>4</sub> sobre el contenido del RP en las líneas celulares se utilizaron los siguientes compuestos: Vehículo de las hormonas (V), ciclodextrina al 2% en agua estéril; E<sub>2</sub> (10 nM) acoplado a ciclodextrina; P<sub>4</sub> (10 nM) acoplada a ciclodextrina. Las células se dividieron en los siguientes grupos:

- 1) V (72 horas)
- 2) E<sub>2</sub> + (48 horas) + V (24 horas)
- 3) E<sub>2</sub> + (48 horas) + P<sub>4</sub> (24 horas)

Para determinar los efectos del ácido okadaico sobre el contenido del RP se utilizaron los siguientes compuestos, Vehículo de las hormonas (V): ciclodextrina al 2% en agua estéril; E<sub>2</sub> (10 nM) acoplado a ciclodextrina; P<sub>4</sub> (10 nM) acoplada a ciclodextrina; vehículo del ácido okadaico (Vh): agua estéril; ácido okadaico 10 y 100 nM. Las células se dividieron en los siguientes grupos:

- 1) V (24 horas) + V + V
- 2) E<sub>2</sub> (24 horas) + Vh (2 horas)+ E<sub>2</sub> (24 horas)
- 3) E<sub>2</sub> (48 horas) + Vh (2 horas) + P<sub>4</sub> (12 y 24 horas)
- 4) E<sub>2</sub> (48 horas) + ácido okadaico 10 nM (2 horas) + P<sub>4</sub> (12 y 24 horas)
- 5) E<sub>2</sub> (48 horas) + ácido okadaico 100 nM (2 horas) + P<sub>4</sub> (12 y 24 horas)

Después de las 48 horas de tratamiento con V o E<sub>2</sub>, las células de los grupos 2 al 5 fueron incubadas con ácido okadaico o su vehículo y 2 horas después se realizó un lavado con PBS y se agregó medio fresco suplementado con E<sub>2</sub> al grupo 2 y P<sub>4</sub> a los grupos 3 al 5 durante 12 horas y 24 horas.

Las células fueron colectadas por medio de lavados con PBS en frío (6°C). La suspensión de células se centrifugó a 2000 rpm durante 3 min., se decantó el sobrenadante y el botón celular se lisó para extraer las proteínas totales.

### **7.2. Extracción de proteínas totales.**

Las células se colocaron en buffer de lisis TDG con un cóctel de inhibidores de proteasas (10 mM Tris-HCl, 1mM ditioneitol, 30% glicerol, 1% Triton X-100, 15 mM azida de sodio, 1 mM EDTA, 4 µg/ml leupeptina, 22 µg/ml aprotinina, 1 mM PMSF) a 4°C.

Las muestras fueron centrifugadas a 15,000 rpm, durante 15 min, a 4°C y se separó el sobrenadante. La concentración de proteínas en el sobrenadante se determinó por el método de Bradford (Bradford, 1976), utilizando albúmina sérica bovina como estándar para construir la curva patrón.

### **7.3. Western Blot.**

Las proteínas obtenidas de las células (40 µg) se separaron por electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida al 7.5% a 80 volts durante 2 horas. Cada muestra se preparó con buffer de carga (Tris 0.5 M pH 6.8, glicerol 10%, SDS 2%, β-mercapto-etanol 5%) en un volumen 1:1 y se hirvieron durante 5 min para depositarse en los geles antes mencionados. Las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (Amersham) a 20 volts, durante 1 hora en una cámara semihúmeda. Posteriormente, las membranas se

bloquearon por 2 horas a temperatura ambiente con una solución de leche descremada en polvo al 5% y albúmina al 0.5% en TBS 1X.

Las membranas fueron incubadas durante 2 horas a temperatura ambiente con los siguientes anticuerpos: anticuerpo primario monoclonal anti RP el cual reconoce a la región AB del RP, (RP AB-52, Santa Cruz sc-810) en una concentración de 1  $\mu\text{g/ml}$ . Las membranas fueron lavadas con TBS-Tween (TBS (pH=7.4) +Tween al 0.1%) 3 veces por 5 minutos. Las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario anti-ratón (IgG-HRP) conjugado a peroxidasa en una concentración de 0.24  $\mu\text{g/ml}$  (Santa Cruz sc-2005). Se utilizó un método de detección de alta sensibilidad (ECL, Amersham Pharmacia Biotech) para determinar la presencia de las proteínas estudiadas. Con este sistema, el peróxido de luminol y un activador son sustrato de la peroxidasa acoplada al anticuerpo secundario que cuando reacciona se genera una señal de quimioluminiscencia al exponer las membranas a placas radiográficas.

Para normalizar las posibles diferencias en la cantidad de proteína cargada, se realizó la determinación de  $\alpha$ -tubulina por medio de la técnica de western blot como se describió previamente.

#### **7.4. Análisis de resultados**

Cada placa fue sometida a un análisis densitométrico utilizando un aparato Scan Primax 600p (Colorado) y el programa KODAK 1D Image Análisis Software para cuantificar la expresión de las isoformas del RP y  $\alpha$ -tubulina, de acuerdo a la intensidad de cada banda. Para cada experimento los datos obtenidos de las proteínas de interés se normalizaron con los de  $\alpha$ -tubulina.

A los datos obtenidos se les aplicó una prueba de ANOVA y posteriormente una t-Student. Se utilizó el programa Prism 2.01 (Graph Pad, CA) para calcular los valores de probabilidad.

## VIII. Resultados

En el presente trabajo se estudió el papel del E<sub>2</sub>, la P<sub>4</sub> y del inhibidor de las fosfatasas PP1 y PP2A, ácido okadaico (AO) sobre la regulación del contenido del RP en células de astrocitoma humano grado IV (D54).

Para determinar los efectos que tienen dichas hormonas sobre la regulación del RP en las líneas celulares de adenocarcinoma mamario humano (T47D) y de astrocitoma humano (D54), se realizó la extracción de proteínas totales de células tratadas con vehículo de las hormonas (V), E<sub>2</sub> (10 nM) y E<sub>2</sub> (10 nM) + P<sub>4</sub> (10 nM) 12 y 24 horas después del último tratamiento con la hormona. Mediante la técnica de Western blot se identificaron las dos isoformas del RP en ambas líneas celulares.

En la figura 10 se muestra un blot donde se localizó una banda de 114 kDa y otra de 94 kDa, que corresponden a las isoformas RP-B y RP-A, respectivamente en las líneas celulares T47D y D54.

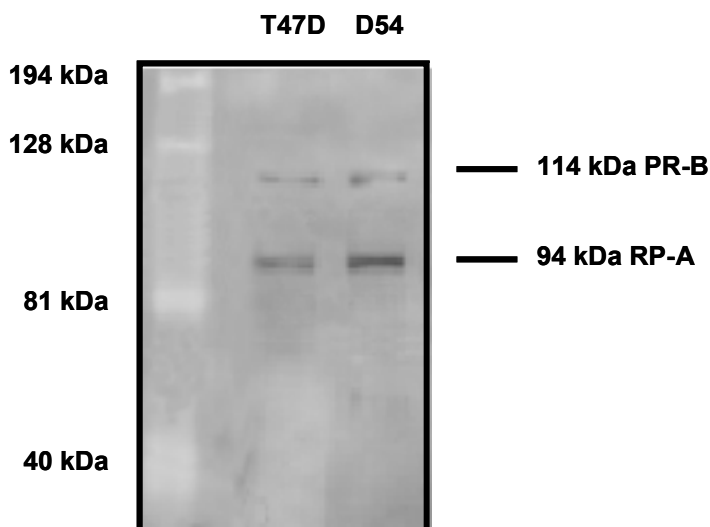


Fig. 10. Identificación de las isoformas del RP por Western Blot en células de adenocarcinoma mamario (T47D) y astrocitoma grado IV (D54).

El cargado de las proteínas se verificó mediante la tinción de los geles con azul de Coomassie (Fig. 11).

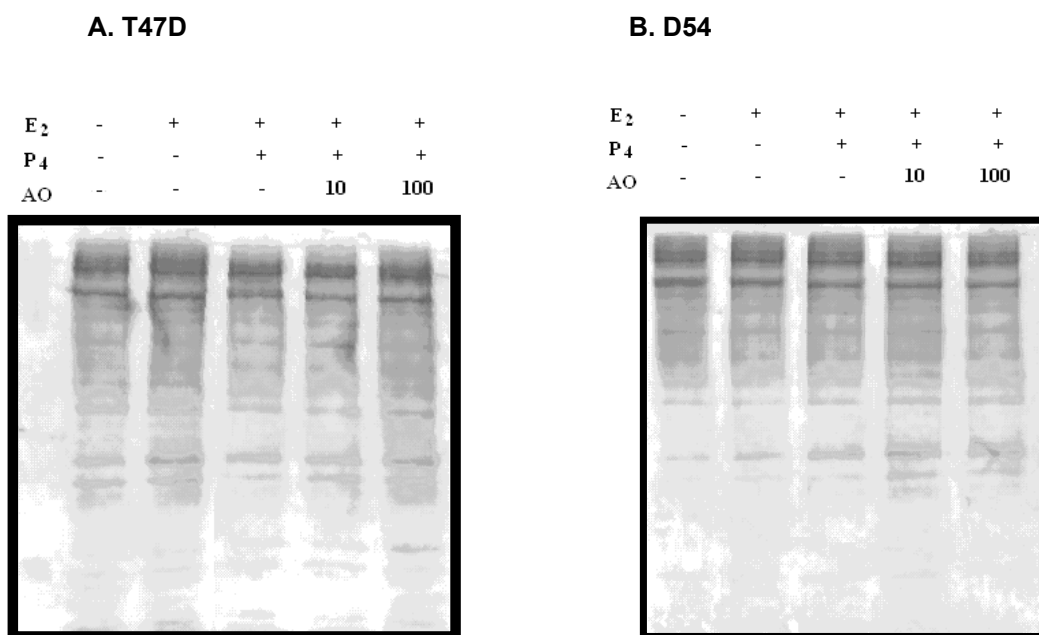


Fig. 11. Gel representativo donde se observan el corrimiento en gel de acrilamida al 7.5% de proteínas totales extraídas de células T47D (A) y D54 (B).

En las figuras siguientes se muestra un blot representativo de cuatro experimentos independientes, donde se localizó una banda de 114 kDa y otra de 94 kDa, que corresponden a las isoformas RP-B y RP-A respectivamente; también se muestra la inmunodetección de la  $\alpha$ -tubulina utilizada como control de carga, con un peso de 55 kDa.

En la figura 12 se muestran los efectos del E<sub>2</sub> y la P<sub>4</sub> después de 12 horas de tratamiento en células T47D (Fig. 12 A) y D54 (Fig. 12 B). En el caso de las células T47D el E<sub>2</sub> incrementó 36% y 75% el contenido de RP-A y RP-B respectivamente y el tratamiento conjunto de E<sub>2</sub> + P<sub>4</sub> causó una disminución de 42% del contenido del RP-A y 34% del RP-B (Fig. 12. A). En las células D54, de manera inesperada, el E<sub>2</sub> disminuyó el contenido de ambas isoformas del RP hasta un 52% (RP-B), sin embargo la P<sub>4</sub> disminuyó aún más el contenido de RP-A y revirtió el efecto del E<sub>2</sub> sobre RP-B (Fig. 12 B).

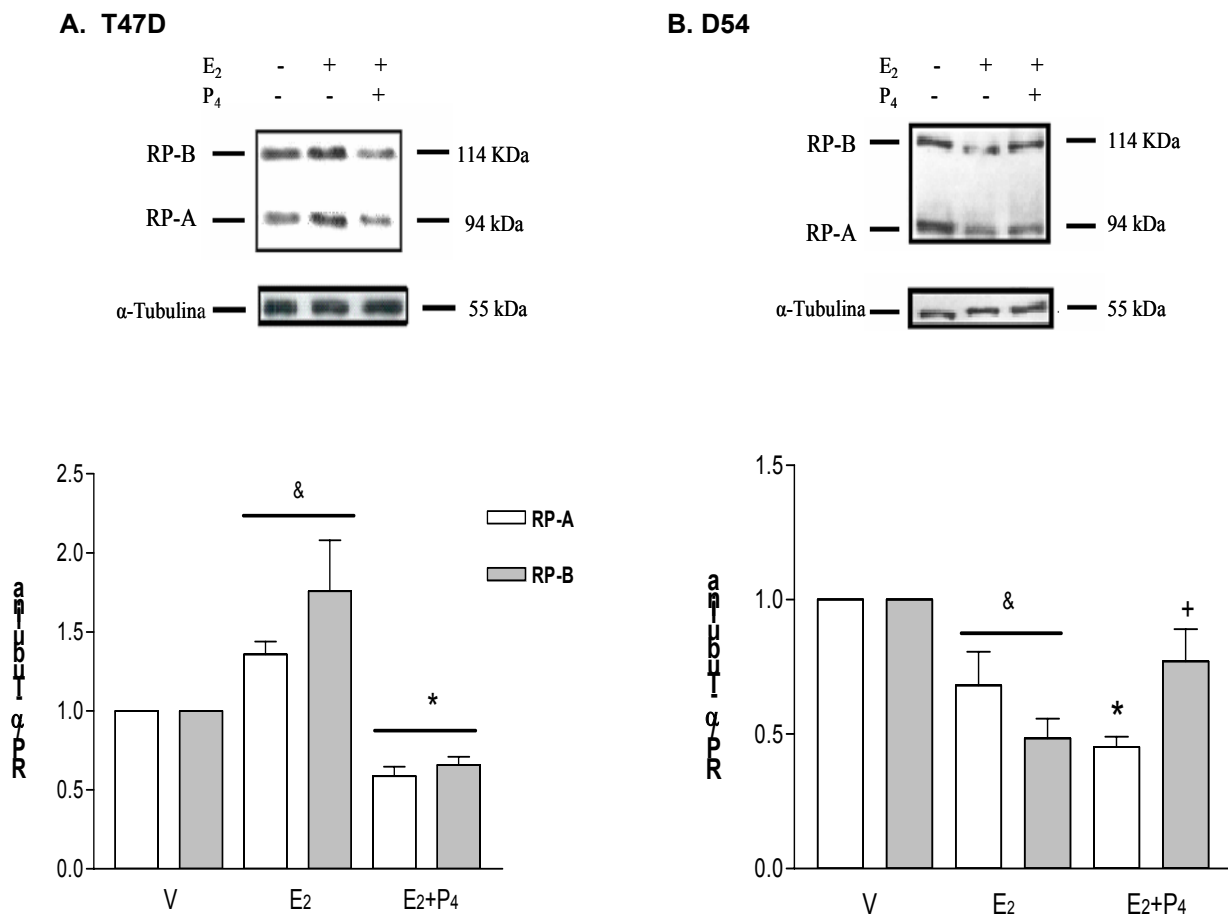


Fig. 12. Análisis del contenido del RP por Western blot en células T47D (A) y D54 (B). Se realizaron cuatro experimentos independientes de la línea T47D y D54 tratadas con Vehículo (V); ciclodextrina al 2% en agua estéril; E<sub>2</sub> (10 nM) y E<sub>2</sub> + P<sub>4</sub> (10 nM). Las isoformas detectadas por Western blot se cuantificaron por medio de un análisis densitométrico y los valores obtenidos se corrigieron respecto a los obtenidos para la tubulina. A, Células T47D; B, Células D54 ambas colectadas a las 12 horas. & p<0.05 vs V y E<sub>2</sub> + P<sub>4</sub>; \* p<0.05 V y E<sub>2</sub>; + p<0.05 vs E<sub>2</sub>.



En la figura 13 se muestra un blot representativo y las gráficas correspondientes de células colectadas 24 horas después de los diferentes tratamientos. La regulación en el contenido de las isoformas del RP por el E<sub>2</sub> sólo ocurrió en la línea T47D, donde se observó un incremento significativo en el contenido de ambas isoformas del RP, siendo RP-B más susceptible al tratamiento con E<sub>2</sub> incrementando 153% su contenido, mientras que RP-A incrementó sólo 48%. Además, el tratamiento de E<sub>2</sub> + P<sub>4</sub> disminuyó el contenido de ambas isoformas del RP (67% en RP-A y 47% en RP-B) en relación al tratamiento con E<sub>2</sub> (Fig. 13 A). En el caso de la línea D54 el E<sub>2</sub> no ejerció efectos significativos sobre el contenido del RP y la combinación de E<sub>2</sub> + P<sub>4</sub> causó una reducción más discreta (27% en RP-A y 20% en RP-B) en su contenido (Fig. 13 B).

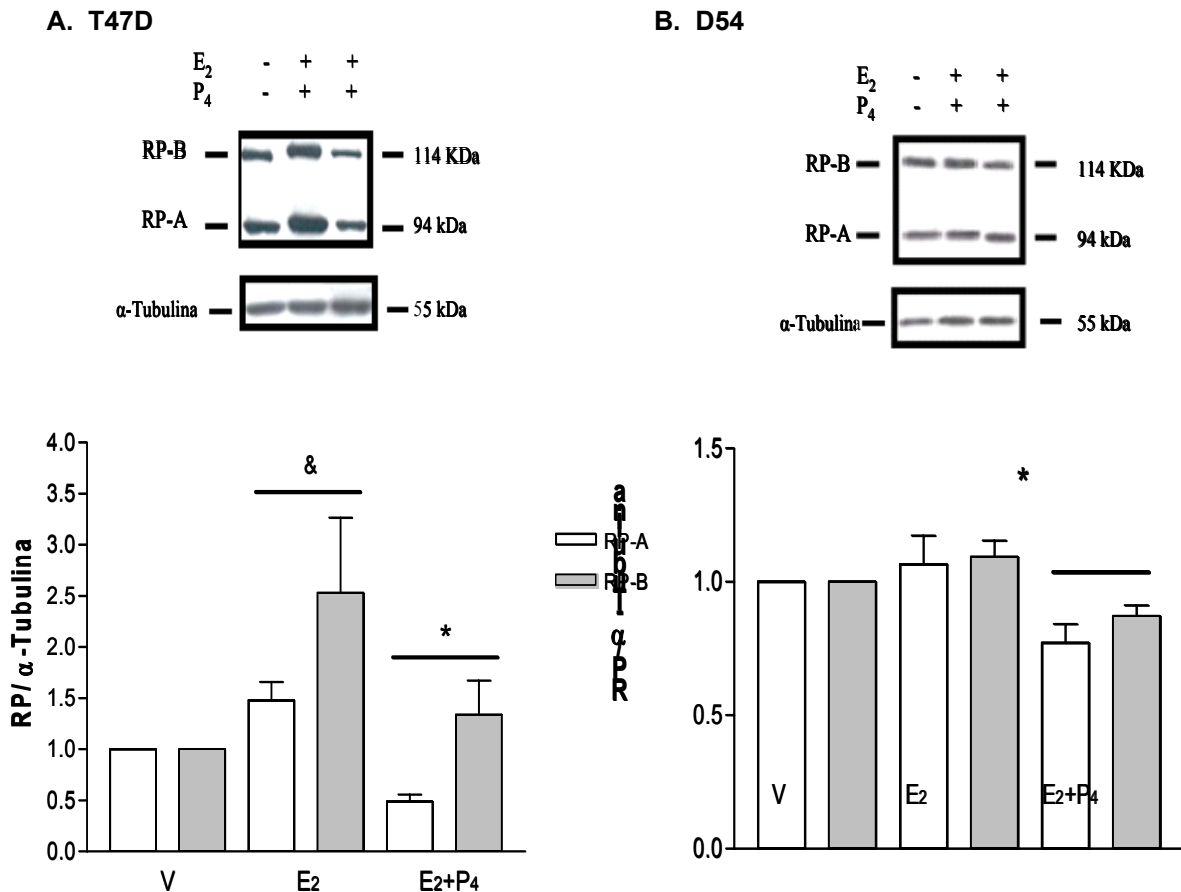


Fig. 13. Contenido de RP en células T47D y D54 tratadas con Vehículo (V): ciclodextrina al 2% en agua estéril; E<sub>2</sub> (10 nM) y E<sub>2</sub>+P<sub>4</sub> (10 nM). Las proteínas fueron detectadas por western blot como se mencionó en la figura anterior. A, Células T47D; B, Células D54 ambas colectadas a las 24 horas. & p<0.05 vs V y E<sub>2</sub>+P<sub>4</sub>; \* p<0.05 vs V y E<sub>2</sub>.

Una vez estudiada la regulación del receptor por  $E_2$  y  $P_4$ , se realizaron experimentos para determinar el contenido del RP en la línea de astrocitoma humano D54 en presencia del inhibidor de fosfatasa, ácido okadaico. Para lo cual se extrajeron proteínas totales de células 12 (Fig. 14) y 24 horas (Fig. 15) después de la administración de los tratamientos con hormonas + ácido okadaico (AO) o su vehículo (agua estéril).

En la figura 14 se muestra el efecto del ácido okadaico sobre el contenido de las isoformas del RP 12 horas después de los diferentes tratamientos hormonales en la línea de astrocitoma humano D54. En esta figura se puede apreciar que el AO a una concentración baja (10 nM), no tuvo ningún efecto respecto al tratamiento con  $E_2$  +  $P_4$ , mientras que a una dosis mayor (100 nM) se potenció el efecto de la  $P_4$ , ya que ambas isoformas disminuyeron de manera significativa respecto al tratamiento con  $E_2$  +  $P_4$ . Dicha disminución fue más evidente en el RP-A (69%) respecto a RP-B (49%) (Fig. 14).

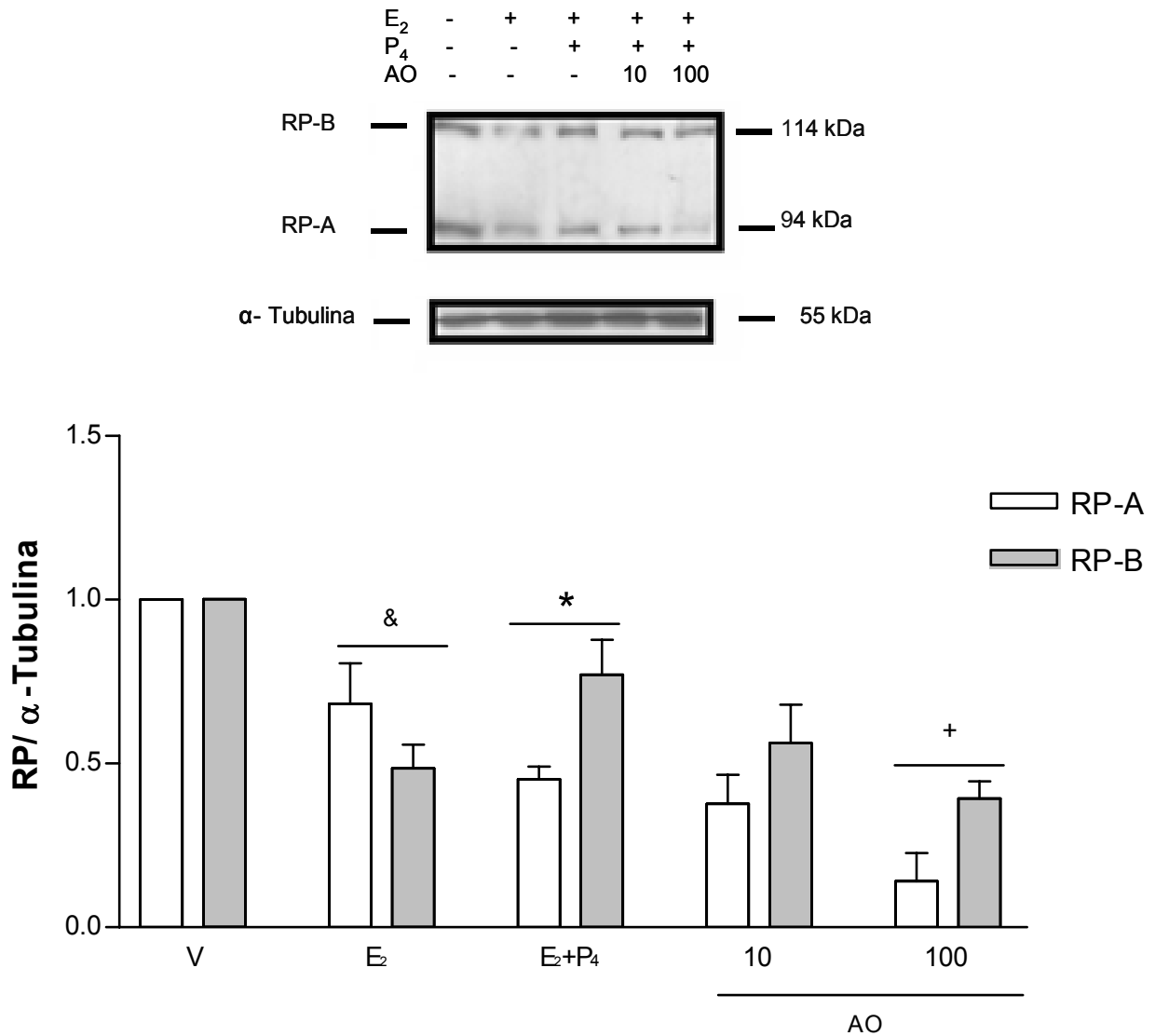


Fig. 14. Efecto del ácido okadaico sobre el contenido del RP. Análisis realizado por medio de la técnica de Western blot en células D54 (12 horas) tratadas con: V: ciclodextrina; E<sub>2</sub> (10 nM); E<sub>2</sub> (10 nM); E<sub>2</sub> (10nM) + Ácido okadaico -AO- (10 y 100 nM), V (agua estéril) y P<sub>4</sub> (10 nM). Las isoformas detectadas por Western blot se cuantificaron por medio de un análisis densitométrico y los valores obtenidos se corrigieron respecto a los obtenidos para la tubulina. & p<0.05 vs V y E<sub>2</sub> + P<sub>4</sub>; \* p<0.05 vs V; + p<0.05 vs V y E<sub>2</sub> + P<sub>4</sub>.

En la figura 15 se observan los efectos de las hormonas y del AO en la línea de astrocitoma humano D54 24 horas después de los tratamientos correspondientes. Al igual que a las 12 horas, la dosis de 10 nM de AO no tuvo efectos significativos sobre el contenido del RP-A, aunque aumentó un 23% el contenido del RP-B. La dosis más alta de AO (100 nM) provocó un efecto similar al

observado a las 12 horas, potenciando la disminución tanto del RP-A (42%) como del RP-B (26%) por el tratamiento con P<sub>4</sub>. Cabe mencionar que al igual que a las 12 horas la isoforma A del RP fue más susceptible al tratamiento con AO.

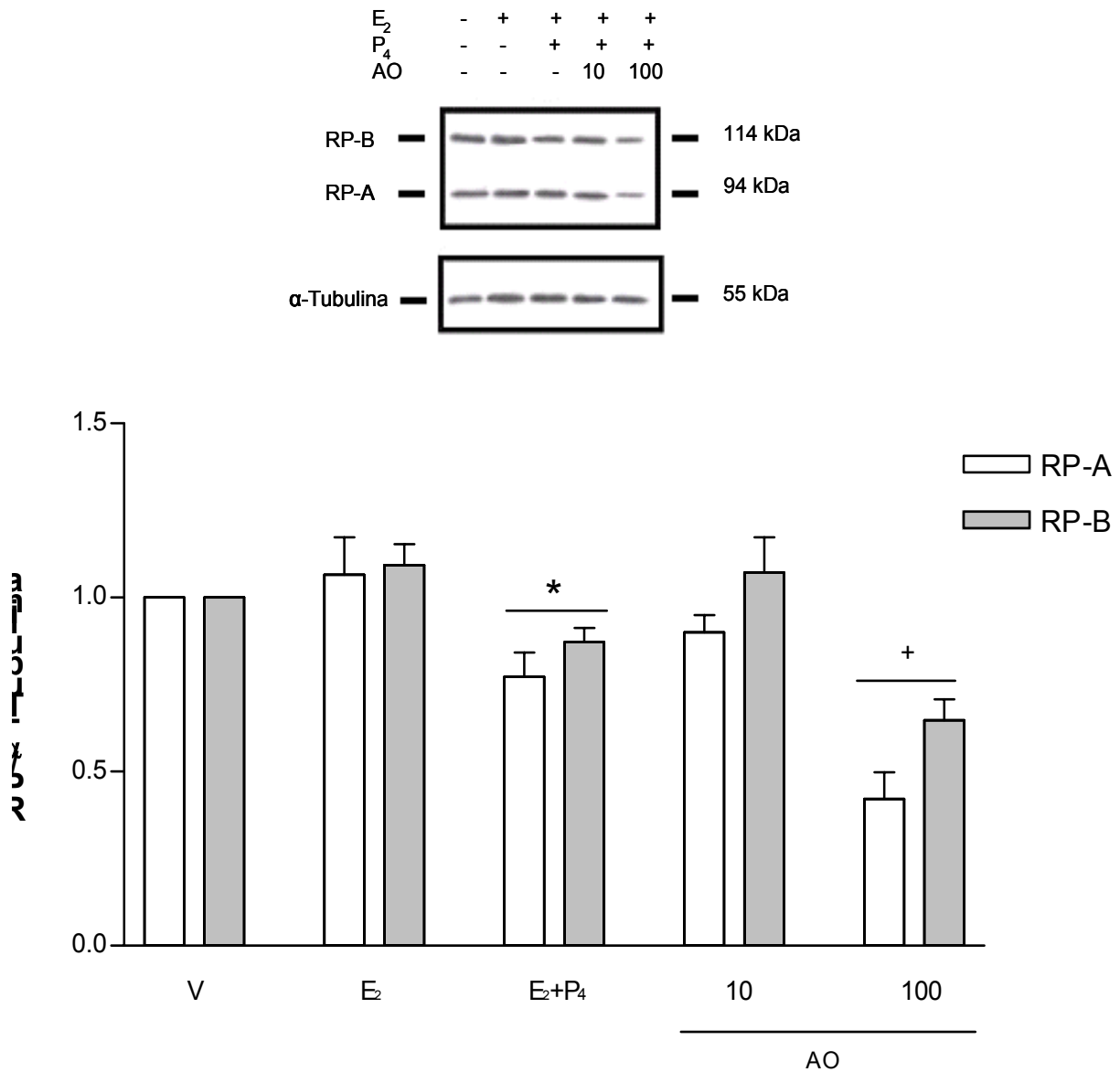


Fig. 15. Efecto del ácido okadaico, el E<sub>2</sub> y la P<sub>4</sub> sobre el contenido del RP en células D54 (24 horas). Se realizaron 4 experimentos independientes de la línea D54 tratadas con: V: ciclodextrina; E<sub>2</sub> (10 nM); E<sub>2</sub> (10 nM); E<sub>2</sub> (10nM) + Ácido okadaico -AO- (10 y 100 nM), Vh (agua estéril) y P<sub>4</sub> (10 nM). Las isoformas detectadas por Western blot se cuantificaron por medio de un análisis densitométrico y los valores obtenidos se corrigieron respecto a los obtenidos para la tubulina. \* p<0.05 vs V y E<sub>2</sub>; + p<0.05 vs V, E<sub>2</sub>+P<sub>4</sub>, y OA.

## IX. DISCUSIÓN

### *Regulación del RP por E<sub>2</sub> y P<sub>4</sub> en células T47D y D54*

En el presente estudio se determinó el papel del E<sub>2</sub> y la P<sub>4</sub> sobre el contenido del RP en células en cultivo derivadas de cáncer de mama y astrocitoma humanos por medio de la técnica de western blot. Los resultados obtenidos muestran que el contenido del RP está diferencialmente regulado por el E<sub>2</sub> y la P<sub>4</sub> en células de astrocitoma humano grado IV, D54, y en las células de adenocarcinoma mamario T47D.

En muchos tipos celulares, incluyendo las células T47D, utilizadas como control para los tratamientos hormonales, la regulación positiva del RP por E<sub>2</sub> está mediada por el receptor a estrógenos (Camacho-Arroyo, 2003; Kastner et al., 1990; Guerra-Araiza, 2003). El ER- $\alpha$  interactúa con elementos de respuesta a estrógenos (ERE) localizados en la región promotora del RP. Estudios en diversos tejidos reproductivos así como en células de cáncer de mama MCF7 han demostrado que el tratamiento con E<sub>2</sub> incrementa el contenido del RP y que este incremento es dependiente de la expresión del RE- $\alpha$  (Kontula et al., 1975; Nardulli et al., 1996).

En contraste con esos datos, en el presente estudio se encontró que el E<sub>2</sub> no incrementó el contenido del RP en las células de astrocitoma humano D54. De hecho, se mostró una reducción significativa de ambas isoformas del RP a las 12 horas después del tratamiento con E<sub>2</sub>; y no hubo ningún efecto significativo sobre el contenido del RP después de 24 horas de tratamiento con E<sub>2</sub>. Existen evidencias de que en líneas celulares derivadas de cáncer de ovario (HOSE y OVCA) el tratamiento con estrógenos (10 nM) provocó una disminución significativa del RP tanto al nivel del mRNA, como al nivel de la proteína. Cabe mencionar que las células HOSE presenta menor contenido de RE- $\alpha$  y mayor contenido en RE- $\beta$  (Mukherjee et al., 2005). El mecanismo involucrado en la

regulación negativa por E<sub>2</sub> en estas células se desconoce aunque el tratamiento con un inhibidor del RE (ICI 182 780) revirtió el efecto del E<sub>2</sub> sobre el contenido del RP.

El mecanismo involucrado en la falta de regulación por E<sub>2</sub> en las células D54 no se conoce, aunque es interesante mencionar que en astrocitomas grado IV derivados de biopsias de pacientes, las cuales corresponden al mismo grado que las células D54, no se detectó RE- $\alpha$  (González-Agüero et al., 2001) y sólo en algunos casos se ha reportado la presencia del RE- $\beta$  (Carroll et al., 1995; Stojkovic, 1989; Assimakopoulou, 1998; Batistatou, 2004). La carencia de RE- $\alpha$  podría explicar la falta de inducción de la expresión del RP por E<sub>2</sub>.

La expresión de las isoformas del RE en las células D54 así como los mecanismos involucrados en la disminución del RP por E<sub>2</sub> en estas células después de 12 horas del tratamiento con E<sub>2</sub> requiere de investigaciones posteriores.

El tratamiento con P<sub>4</sub> redundó en la regulación negativa del RP tanto en las células D54 como en las T47D a 12 y 24 horas. La regulación negativa del RP por su ligando se ha reportado tanto en modelos *in vivo* como *in vitro*. Se sabe que la P<sub>4</sub> induce la fosforilación del RP para que éste pueda ser funcional y entonces lleve a cabo su efecto genómico, aunque también es una señal para que el RP sea degradado por el proteosoma 26S, dicha regulación negativa se presenta desde las 6 horas del tratamiento con la hormona y el contenido del RP continúa disminuyendo a lo largo del tiempo (12 y 24 horas)(Lange, 2000; Turgeon y Waring, 2000; Shen et al., 2001; Camacho Arroyo et al., 2002; Lange et al., 2004).

*Regulación del contenido del RP por la inhibición de PP1 y PP2A con ácido okadaico en células T47D y D54*

En las células D54 a las 12 y 24 horas, los tratamientos conjuntos de las hormonas ( $E_2$  y  $P_4$ ) y ácido okadaico en una concentración baja (10 nM), no tuvo efecto, mientras que a una dosis mayor (100 nM) se presentó un efecto negativo en la regulación de ambas isoformas del RP. Tanto PP1 y PP2A pueden ser inhibidas desde un 30% por ácido okadaico en bajas concentraciones (desde 10 nM), encontrándose que la actividad de PP1 y PP2A puede inhibirse hasta en un 85% con la concentración de 100 nM (Favre et al., 1997) que fue la misma con la que obtuvimos el decremento significativo en el contenido del RP.

Se tienen datos que indican que en células CV1 (células de riñón de mono) tratadas con ácido okadaico, se incrementa la fosforilación del RP así como su actividad transcripcional por efecto de la inhibición de PP1 y PP2A (Danner et al., 1990; Beck et al. 1992). El incremento en el contenido del RP fosforilado así como su actividad transcripcional podría estar dado por un aumento en la actividad de las cinasas que fosforilan al RP debido a la inhibición de PP1 y PP2A. El tratamiento de fibroblastos de humano y de ratón con ácido okadaico incrementa la fosforilación de MAPK 42/ERK-2 (Gehring M et al., 2004); por el contrario el PP2A disminuye la actividad de MAPK 42/ERK2 y MAPK44/ERK1, las cuales fosforilan del RP en la posición 294, sitio implicado en la actividad transcripcional y degradación dependiente de ligando del RP (Mumbay et al., 1993). En células Rad91 (células epiteliales pulmonares) se ha observado que la subunidad catalítica de PP2A interactúa con el dominio de unión al DNA del RE y el tratamiento con ácido okadaico no permite dicha interacción y los niveles de RE fosforilado aumentan. Por otro lado, la administración de ácido okadaico incrementa la asociación del RE con MAPK y dicho incremento disminuye cuando se añade PD98059 (inhibidor de MAPK) (Lu et al., 2003).

El decremento observado podría estar mediado por la inhibición de PP1 y PP2A. Posiblemente un incremento en el contenido del RP fosforilado produce un alto número de moléculas de RP ubiquitinadas que son blanco de proteólisis vía el complejo ubiquitina proteosoma 26S. Por lo tanto el estatus de fosforilación del RP en las células D54 juega un papel importante en el recambio del receptor.

Por otro lado, se ha observado que tanto PP1 como PP2A pueden regular a los receptores a hormonas esteroides al nivel del RNAm, tal es el caso del RE y del RP. En este sistema se observó que la inhibición de las fosfatasas PP1 y PP2A con ácido okadaico (250 nM) reguló de manera negativa el contenido del RNAm del RE. Por otro lado, el tratamiento conjunto con MG 132, inhibidor del proteosoma, redundó en la recuperación del contenido del RNAm del RE debido a la disminución en la degradación de proteínas que al unirse al RNAm del RE en la región 3'UTR le confieren estabilidad (Keen et al., 2005). A nivel de la proteína el tratamiento con MG 132 incrementó el contenido del RP y del RE en diferentes regiones del SNC de la rata (Villamar-Cruz et al., 2006)

El contenido de ambas isoformas del RP fue regulado negativamente por la inhibición de las fosfatasas PP1 y PP2A en las células de astrocitoma humano D54 a las 12 y 24 horas, sin embargo la isoforma A fue más susceptible a dicha regulación mediada por su ligando y por el estatus de fosforilación, sin importar la presencia de menos sitios de fosforilación comparado con RP-B (Pierson, et al., 2004). Los mecanismos involucrados en esta regulación diferencial de las isoformas del RP así como el papel de éstas en el desarrollo de los astrocitomas no se conocen y se requerirá de más estudios en el laboratorio.



## VIII. Resultados

En el presente trabajo se estudió el papel del E<sub>2</sub>, la P<sub>4</sub> y del inhibidor de las fosfatasa PP1 y PP2A, ácido okadaico (AO) sobre la regulación del contenido del RP en células de astrocitoma humano grado IV (D54).

Para determinar los efectos que tienen dichas hormonas sobre la regulación del RP en las líneas celulares de adenocarcinoma mamario humano (T47D) y de astrocitoma humano (D54), se realizó la extracción de proteínas totales de células tratadas con vehículo de las hormonas (V), E<sub>2</sub> (10 nM) y E<sub>2</sub> (10 nM) + P<sub>4</sub> (10 nM) 12 y 24 horas después del último tratamiento con la hormona. Mediante la técnica de Western blot se identificaron las dos isoformas del RP en ambas líneas celulares.

En la figura 10 se muestra un blot donde se localizó una banda de 114 kDa y otra de 94 kDa, que corresponden a las isoformas RP-B y RP-A, respectivamente en las líneas celulares T47D y D54.

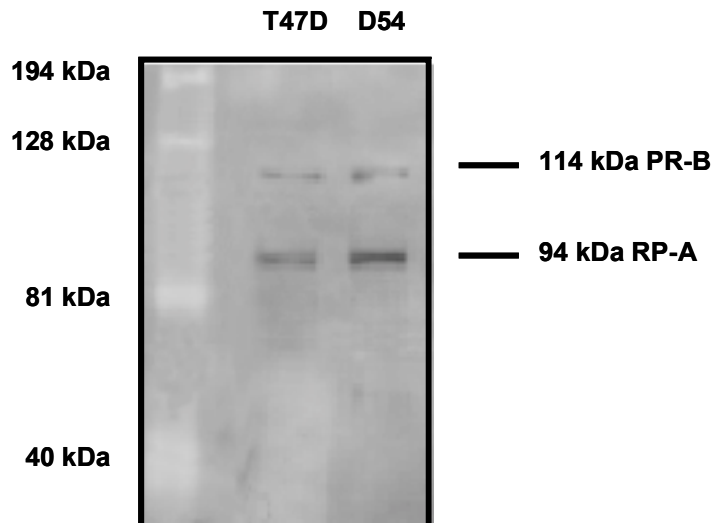


Fig. 10. Identificación de las isoformas del RP por Western Blot en células de adenocarcinoma mamario (T47D) y astrocitoma grado IV (D54).

El cargado de las proteínas se verificó mediante la tinción de los geles con azul de Coomassie (Fig. 11).

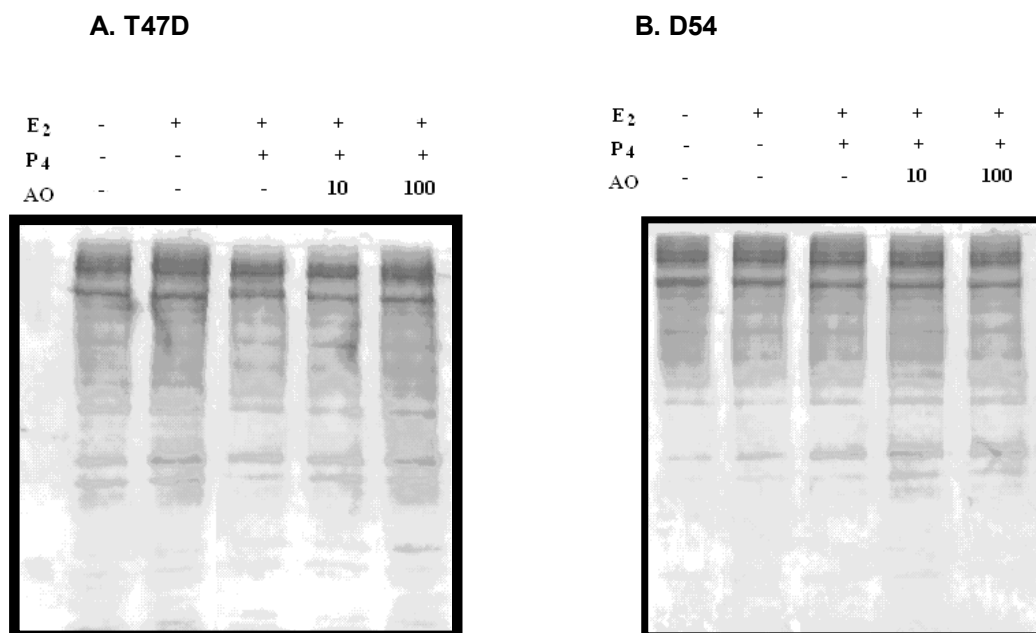


Fig. 11. Gel representativo donde se observan el corrimiento en gel de acrilamida al 7.5% de proteínas totales extraídas de células T47D (A) y D54 (B).

En las figuras siguientes se muestra un blot representativo de cuatro experimentos independientes, donde se localizó una banda de 114 kDa y otra de 94 kDa, que corresponden a las isoformas RP-B y RP-A respectivamente; también se muestra la inmunodetección de la  $\alpha$ -tubulina utilizada como control de carga, con un peso de 55 kDa.

En la figura 12 se muestran los efectos del E<sub>2</sub> y la P<sub>4</sub> después de 12 horas de tratamiento en células T47D (Fig. 12 A) y D54 (Fig. 12 B). En el caso de las células T47D el E<sub>2</sub> incrementó 36% y 75% el contenido de RP-A y RP-B respectivamente y el tratamiento conjunto de E<sub>2</sub> + P<sub>4</sub> causó una disminución de 42% del contenido del RP-A y 34% del RP-B (Fig. 12. A). En las células D54, de manera inesperada, el E<sub>2</sub> disminuyó el contenido de ambas isoformas del RP hasta un 52% (RP-B), sin embargo la P<sub>4</sub> disminuyó aún más el contenido de RP-A y revirtió el efecto del E<sub>2</sub> sobre RP-B (Fig. 12 B).

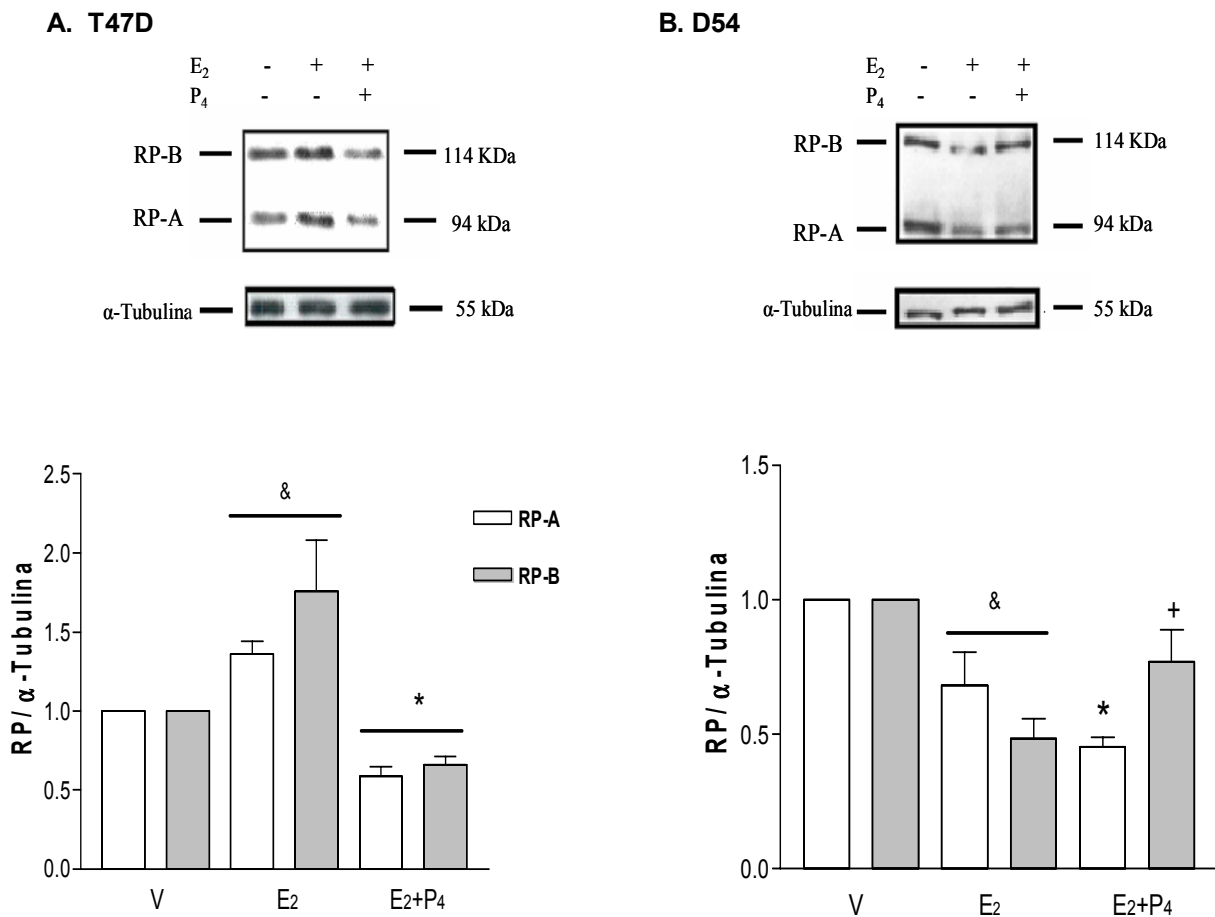


Fig. 12. Análisis del contenido del RP por Western blot en células T47D (A) y D54 (B). Se realizaron cuatro experimentos independientes de la línea T47D y D54 tratadas con Vehículo (V): ciclodextrina al 2% en agua estéril; E<sub>2</sub> (10 nM) y E<sub>2</sub> + P<sub>4</sub> (10 nM). Las isoformas detectadas por Western blot se cuantificaron por medio de un análisis densitométrico y los valores obtenidos se corrigieron respecto a los obtenidos para la tubulina. A, Células T47D; B, Células D54 ambas colectadas a las 12 horas. & p<0.05 vs V y E<sub>2</sub>+P<sub>4</sub>; \* p<0.05 V y E<sub>2</sub>; + p<0.05 vs E<sub>2</sub>.

En la figura 13 se muestra un blot representativo y las gráficas correspondientes de células colectadas 24 horas después de los diferentes tratamientos. La regulación en el contenido de las isoformas del RP por el E<sub>2</sub> sólo ocurrió en la línea T47D, donde se observó un incremento significativo en el contenido de ambas isoformas del RP, siendo RP-B más susceptible al tratamiento con E<sub>2</sub> incrementando 153% su contenido, mientras que RP-A incrementó sólo 48%. Además, el tratamiento de E<sub>2</sub> + P<sub>4</sub> disminuyó el contenido de ambas isoformas del RP (67% en RP-A y 47% en RP-B) en relación al tratamiento con E<sub>2</sub> (Fig. 13 A). En el caso de la línea D54 el E<sub>2</sub> no ejerció efectos significativos sobre el contenido del RP y la combinación de E<sub>2</sub> + P<sub>4</sub> causó una reducción más discreta (27% en RP-A y 20% en RP-B) en su contenido (Fig. 13 B).

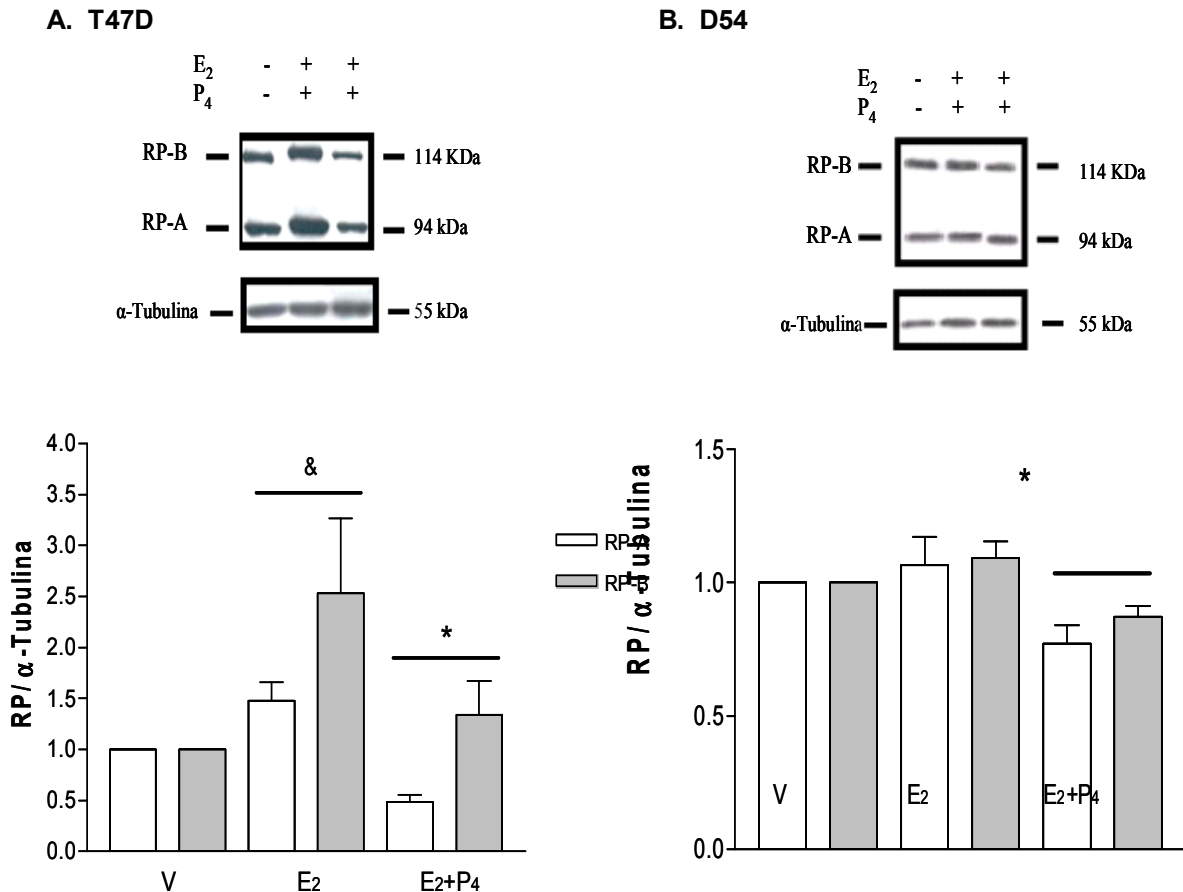


Fig. 13. Contenido de RP en células T47D y D54 tratadas con Vehículo (V): ciclodextrina al 2% en agua estéril; E<sub>2</sub> (10 nM) y E<sub>2</sub>+P<sub>4</sub> (10 nM). Las proteínas fueron detectadas por western blot como se mencionó en la figura anterior. A, Células T47D; B, Células D54 ambas colectadas a las 24 horas. & p < 0.05 vs V y E<sub>2</sub>+P<sub>4</sub>; \* p < 0.05 vs V y E<sub>2</sub>.

Una vez estudiada la regulación del receptor por  $E_2$  y  $P_4$ , se realizaron experimentos para determinar el contenido del RP en la línea de astrocitoma humano D54 en presencia del inhibidor de fosfatasa, ácido okadaico. Para lo cual se extrajeron proteínas totales de células 12 (Fig. 14) y 24 horas (Fig. 15) después de la administración de los tratamientos con hormonas + ácido okadaico (AO) o su vehículo (agua estéril).

En la figura 14 se muestra el efecto del ácido okadaico sobre el contenido de las isoformas del RP 12 horas después de los diferentes tratamientos hormonales en la línea de astrocitoma humano D54. En esta figura se puede apreciar que el AO a una concentración baja (10 nM), no tuvo ningún efecto respecto al tratamiento con  $E_2$  +  $P_4$ , mientras que a una dosis mayor (100 nM) se potenció el efecto de la  $P_4$ , ya que ambas isoformas disminuyeron de manera significativa respecto al tratamiento con  $E_2$  +  $P_4$ . Dicha disminución fue más evidente en el RP-A (69%) respecto a RP-B (49%) (Fig. 14).

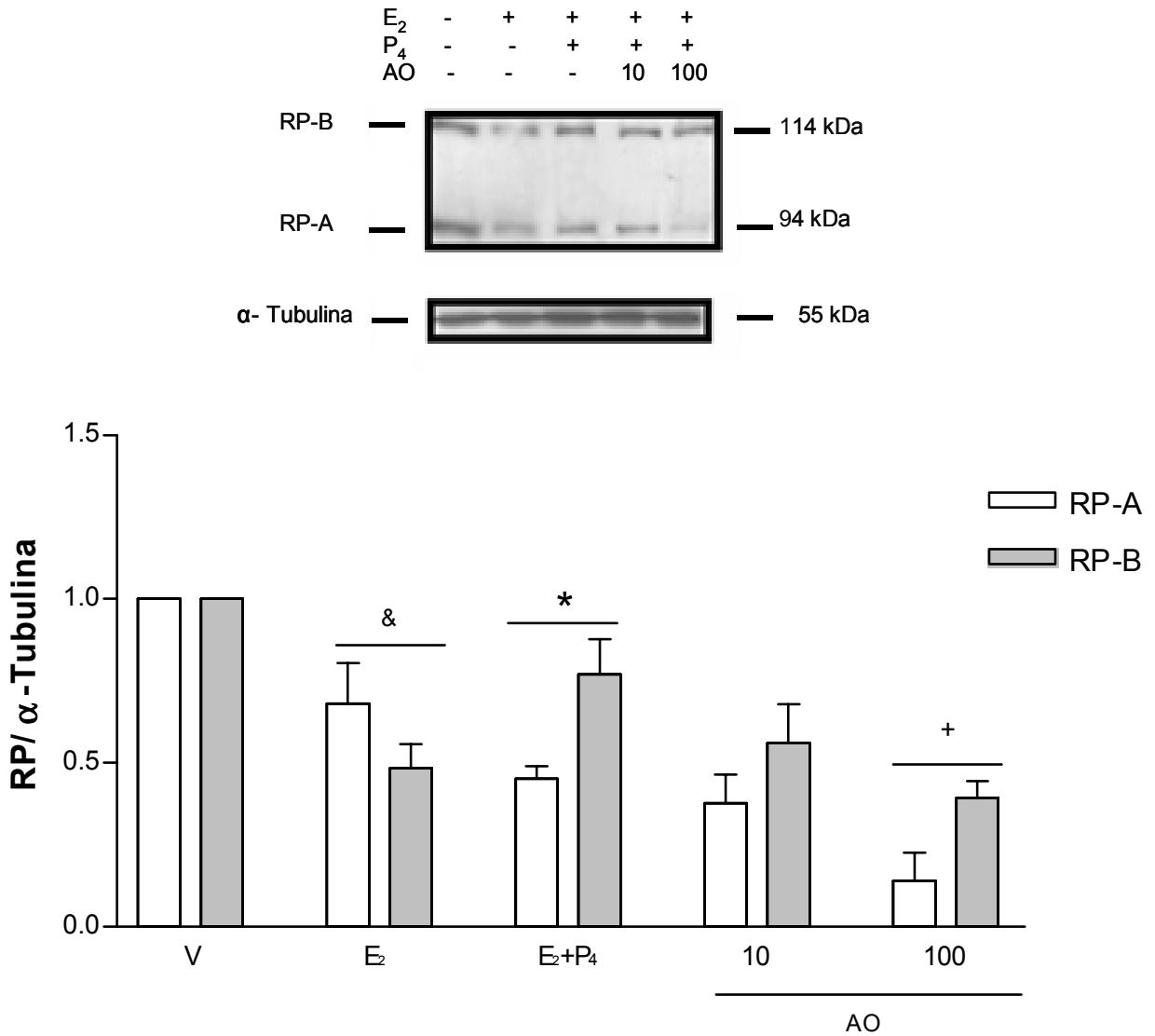


Fig. 14. Efecto del ácido okadaico sobre el contenido del RP. Análisis realizado por medio de la técnica de Western blot en células D54 (12 horas) tratadas con: V: ciclodextrina; E<sub>2</sub> (10 nM); E<sub>2</sub> (10 nM); E<sub>2</sub> (10nM) + Ácido okadaico -AO- (10 y 100 nM), V (agua estéril) y P<sub>4</sub> (10 nM). Las isoformas detectadas por Western blot se cuantificaron por medio de un análisis densitométrico y los valores obtenidos se corrigieron respecto a los obtenidos para la tubulina. & p<0.05 vs V y E<sub>2</sub> + P<sub>4</sub>; \* p<0.05 vs V; + p<0.05 vs V y E<sub>2</sub> + P<sub>4</sub>.

En la figura 15 se observan los efectos de las hormonas y del AO en la línea de astrocitoma humano D54 24 horas después de los tratamientos correspondientes. Al igual que a las 12 horas, la dosis de 10 nM de AO no tuvo efectos significativos sobre el contenido del RP-A, aunque aumentó un 23% el contenido del RP-B. La dosis más alta de AO (100 nM) provocó un efecto similar al

observado a las 12 horas, potenciando la disminución tanto del RP-A (42%) como del RP-B (26%) por el tratamiento con P<sub>4</sub>. Cabe mencionar que al igual que a las 12 horas la isoforma A del RP fue más susceptible al tratamiento con AO.

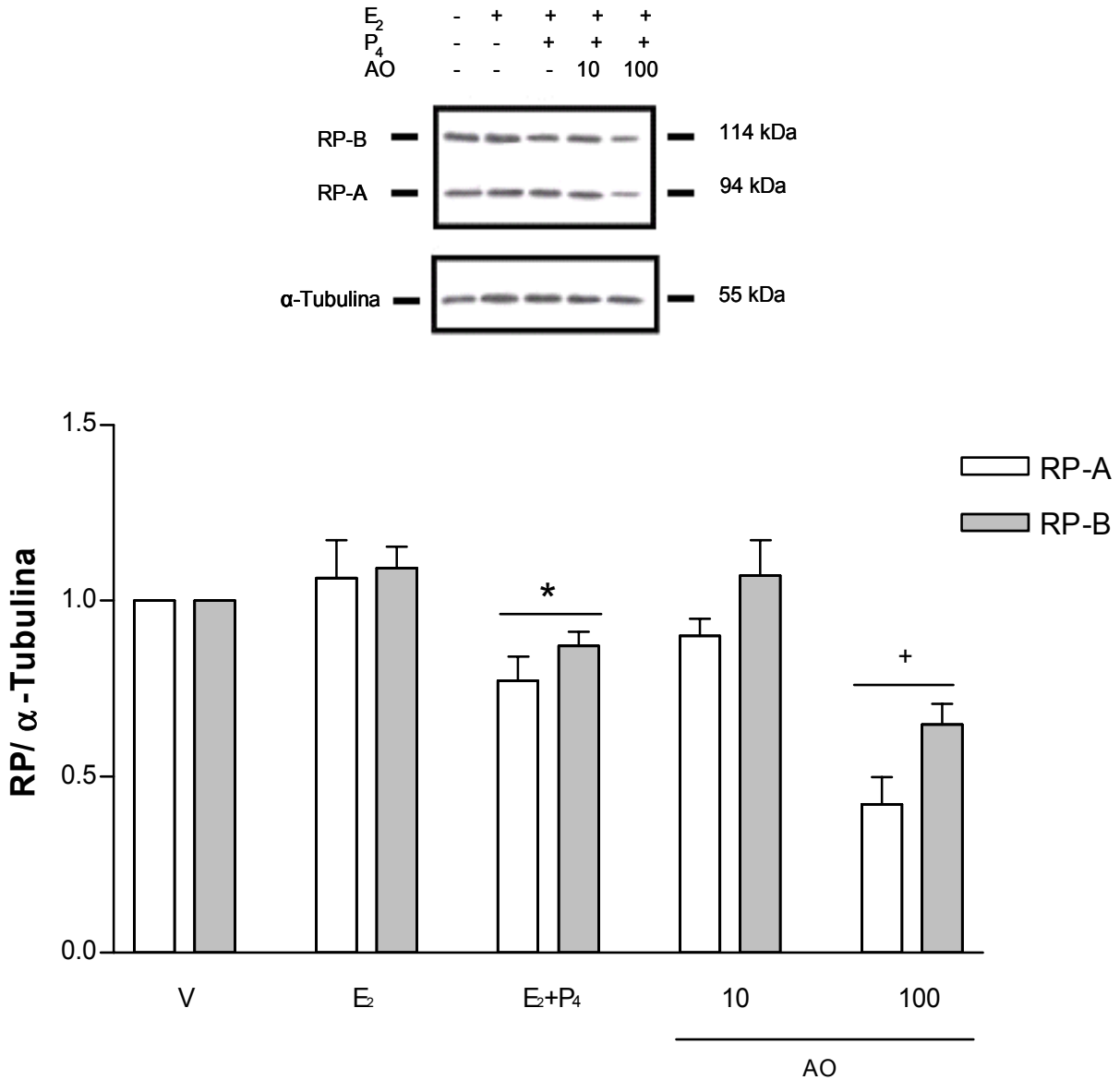


Fig. 15. Efecto del ácido okadaico, el E<sub>2</sub> y la P<sub>4</sub> sobre el contenido del RP en células D54 (24 horas). Se realizaron 4 experimentos independientes de la línea D54 tratadas con: V: ciclodextrina; E<sub>2</sub> (10 nM); E<sub>2</sub> (10 nM); E<sub>2</sub> (10nM) + Ácido okadaico -AO- (10 y 100 nM), Vh (agua estéril) y P<sub>4</sub> (10 nM). Las isoformas detectadas por Western blot se cuantificaron por medio de un análisis densitométrico y los valores obtenidos se corrigieron respecto a los obtenidos para la tubulina. \* p<0.05 vs V y E<sub>2</sub>; + p<0.05 vs V, E<sub>2</sub>+P<sub>4</sub>, y OA.

## IX. DISCUSIÓN

### *Regulación del RP por E<sub>2</sub> y P<sub>4</sub> en células T47D y D54*

En el presente estudio se determinó el papel del E<sub>2</sub> y la P<sub>4</sub> sobre el contenido del RP en células en cultivo derivadas de cáncer de mama y astrocitoma humanos por medio de la técnica de western blot. Los resultados obtenidos muestran que el contenido del RP está diferencialmente regulado por el E<sub>2</sub> y la P<sub>4</sub> en células de astrocitoma humano grado IV, D54, y en las células de adenocarcinoma mamario T47D.

En muchos tipos celulares, incluyendo las células T47D, utilizadas como control para los tratamientos hormonales, la regulación positiva del RP por E<sub>2</sub> está mediada por el receptor a estrógenos (Camacho-Arroyo, 2003; Kastner et al., 1990; Guerra-Araiza, 2003). El ER- $\alpha$  interactúa con elementos de respuesta a estrógenos (ERE) localizados en la región promotora del RP. Estudios en diversos tejidos reproductivos así como en células de cáncer de mama MCF7 han demostrado que el tratamiento con E<sub>2</sub> incrementa el contenido del RP y que este incremento es dependiente de la expresión del RE- $\alpha$  (Kontula et al., 1975; Nardulli et al., 1996).

En contraste con esos datos, en el presente estudio se encontró que el E<sub>2</sub> no incrementó el contenido del RP en las células de astrocitoma humano D54. De hecho, se mostró una reducción significativa de ambas isoformas del RP a las 12 horas después del tratamiento con E<sub>2</sub>; y no hubo ningún efecto significativo sobre el contenido del RP después de 24 horas de tratamiento con E<sub>2</sub>. Existen evidencias de que en líneas celulares derivadas de cáncer de ovario (HOSE y OVCA) el tratamiento con estrógenos (10 nM) provocó una disminución significativa del RP tanto al nivel del mRNA, como al nivel de la proteína. Cabe mencionar que las células HOSE presenta menor contenido de RE- $\alpha$  y mayor contenido en RE- $\beta$  (Mukherjee et al., 2005). El mecanismo involucrado en la



regulación negativa por E<sub>2</sub> en estas células se desconoce aunque el tratamiento con un inhibidor del RE (ICI 182 780) revirtió el efecto del E<sub>2</sub> sobre el contenido del RP.

El mecanismo involucrado en la falta de regulación por E<sub>2</sub> en las células D54 no se conoce, aunque es interesante mencionar que en astrocitomas grado IV derivados de biopsias de pacientes, las cuales corresponden al mismo grado que las células D54, no se detectó RE- $\alpha$  (González-Agüero et al., 2001) y sólo en algunos casos se ha reportado la presencia del RE- $\beta$  (Carroll et al., 1995; Stojkovic, 1989; Assimakopoulou, 1998; Batistatou, 2004). La carencia de RE- $\alpha$  podría explicar la falta de inducción de la expresión del RP por E<sub>2</sub>.

La expresión de las isoformas del RE en las células D54 así como los mecanismos involucrados en la disminución del RP por E<sub>2</sub> en estas células después de 12 horas del tratamiento con E<sub>2</sub> requiere de investigaciones posteriores.

El tratamiento con P<sub>4</sub> redundó en la regulación negativa del RP tanto en las células D54 como en las T47D a 12 y 24 horas. La regulación negativa del RP por su ligando se ha reportado tanto en modelos *in vivo* como *in vitro*. Se sabe que la P<sub>4</sub> induce la fosforilación del RP para que éste pueda ser funcional y entonces lleve a cabo su efecto genómico, aunque también es una señal para que el RP sea degradado por el proteosoma 26S, dicha regulación negativa se presenta desde las 6 horas del tratamiento con la hormona y el contenido del RP continúa disminuyendo a lo largo del tiempo (12 y 24 horas)(Lange, 2000; Turgeon y Waring, 2000; Shen et al., 2001; Camacho Arroyo et al., 2002; Lange et al., 2004).

*Regulación del contenido del RP por la inhibición de PP1 y PP2A con ácido okadaico en células T47D y D54*

En las células D54 a las 12 y 24 horas, los tratamientos conjuntos de las hormonas ( $E_2$  y  $P_4$ ) y ácido okadaico en una concentración baja (10 nM), no tuvo efecto, mientras que a una dosis mayor (100 nM) se presentó un efecto negativo en la regulación de ambas isoformas del RP. Tanto PP1 y PP2A pueden ser inhibidas desde un 30% por ácido okadaico en bajas concentraciones (desde 10 nM), encontrándose que la actividad de PP1 y PP2A puede inhibirse hasta en un 85% con la concentración de 100 nM (Favre et al., 1997) que fue la misma con la que obtuvimos el decremento significativo en el contenido del RP.

Se tienen datos que indican que en células CV1 (células de riñón de mono) tratadas con ácido okadaico, se incrementa la fosforilación del RP así como su actividad transcripcional por efecto de la inhibición de PP1 y PP2A (Danner et al., 1990; Beck et al. 1992). El incremento en el contenido del RP fosforilado así como su actividad transcripcional podría estar dado por un aumento en la actividad de las cinasas que fosforilan al RP debido a la inhibición de PP1 y PP2A. El tratamiento de fibroblastos de humano y de ratón con ácido okadaico incrementa la fosforilación de MAPK 42/ERK-2 (Gehring M et al., 2004); por el contrario el PP2A disminuye la actividad de MAPK 42/ERK2 y MAPK44/ERK1, las cuales fosforilan del RP en la posición 294, sitio implicado en la actividad transcripcional y degradación dependiente de ligando del RP (Mumbay et al., 1993). En células Rad91 (células epiteliales pulmonares) se ha observado que la subunidad catalítica de PP2A interactúa con el dominio de unión al DNA del RE y el tratamiento con ácido okadaico no permite dicha interacción y los niveles de RE fosforilado aumentan. Por otro lado, la administración de ácido okadaico incrementa la asociación del RE con MAPK y dicho incremento disminuye cuando se añade PD98059 (inhibidor de MAPK) (Lu et al., 2003).

El decremento observado podría estar mediado por la inhibición de PP1 y PP2A. Posiblemente un incremento en el contenido del RP fosforilado produce un alto número de moléculas de RP ubiquitinadas que son blanco de proteólisis vía el complejo ubiquitina proteosoma 26S. Por lo tanto el estatus de fosforilación del RP en las células D54 juega un papel importante en el recambio del receptor.

Por otro lado, se ha observado que tanto PP1 como PP2A pueden regular a los receptores a hormonas esteroides al nivel del RNAm, tal es el caso del RE y del RP. En este sistema se observó que la inhibición de las fosfatasas PP1 y PP2A con ácido okadaico (250 nM) reguló de manera negativa el contenido del RNAm del RE. Por otro lado, el tratamiento conjunto con MG 132, inhibidor del proteosoma, redundó en la recuperación del contenido del RNAm del RE debido a la disminución en la degradación de proteínas que al unirse al RNAm del RE en la región 3'UTR le confieren estabilidad (Keen et al., 2005). A nivel de la proteína el tratamiento con MG 132 incrementó el contenido del RP y del RE en diferentes regiones del SNC de la rata (Villamar-Cruz et al., 2006)

El contenido de ambas isoformas del RP fue regulado negativamente por la inhibición de las fosfatasas PP1 y PP2A en las células de astrocitoma humano D54 a las 12 y 24 horas, sin embargo la isoforma A fue más susceptible a dicha regulación mediada por su ligando y por el estatus de fosforilación, sin importar la presencia de menos sitios de fosforilación comparado con RP-B (Pierson, et al., 2004). Los mecanismos involucrados en esta regulación diferencial de las isoformas del RP así como el papel de éstas en el desarrollo de los astrocitomas no se conocen y se requerirá de más estudios en el laboratorio.

## X. CONCLUSIONES

- En la línea celular de astrocitoma humano grado IV (D54) el contenido del RP se regula negativamente por  $P_4$ . El  $E_2$ , a diferencia de otras líneas celulares, no induce al RP.
- Las fosfatasas PP1 y PP2A están involucradas en la regulación negativa del contenido del RP mediada por  $P_4$  en células de astrocitoma humano D54.

**XI. Apéndice**

11.1. TBS.

|           |        |
|-----------|--------|
| Tris-Base | 50 mM  |
| NaCl      | 150 mM |
| *pH 7.5   |        |

XI.1 Solución de corrida.

|           |        |
|-----------|--------|
| Tris-Base | 25 mM  |
| NaCl      | 192 mM |
| SDS       | 10%    |

11. 3. Solución de transferencia.

|           |       |
|-----------|-------|
| Tria-Base | 48 mM |
| Glicina   | 39 mM |
| SDS       | 0.37% |
| Metanol   | 20%   |

11.4. Solución de bloqueo.

|                          |      |
|--------------------------|------|
| Leche desremada en polvo | 5%   |
| Albúmina                 | 0.5% |
| *Preparar en TBS pH 7.5  |      |

## 11.5. Buffer de lisis.

|            |            |
|------------|------------|
| DTT        | 1 mM       |
| Tris-HC    | 10 mM      |
| Gliserol   | 30%        |
| EDTA       | 1 mM       |
| Tritón     | 1%         |
| Leupeptina | 4 µg/mL    |
| Aprotinina | 22.5 µg/mL |
| PMSF       | 1 mM       |
| Azida      | 15 mM      |

## 11.6. Buffer de carga.

|                    |       |
|--------------------|-------|
| Tris-Base          | 50 mM |
| SDS                | 2%    |
| B-Mercaptoetanol   | 5%    |
| Azul de Bromofenol | 0.1%  |
| Glicerol           | 10%   |

## 12.7. Anticuerpos utilizados

Anticuerpo monoclonal anti RP (RP AB-52, Santa-Cruz sc-810)

Anticuerpo anti-ratón (Santa-Cruz sc-2005)

Anticuerpo monoclonal anti-actina (Santa-Cruz sc 1615)

## **XII. Abreviaturas**

AF: función de activación

AMPC: Monofosfato 5' de adenosina cíclico

AO: Ácido okadaico

Ca<sup>2+</sup>: Calcio

Cl<sup>-</sup>: Cloro

DAG: Diacil glicerol

DBD: dominio de unión al DNA

E<sub>2</sub>: Estradiol

EGF: Factor de crecimiento epidermal

ERE: Elemento de respuesta a estrógenos

ERH: elemento de respuesta hormonal

G, αβγ: Subunidades de la proteína G

G: Proteína G

GABA: Ácido gamma aminobutírico

HSP: Proteína de choque térmico

IP3: Inositol Trifosfato

K<sup>+</sup>: Potasio

LBD: dominio de unión al ligando

MAPK: Proteína Cinasa Activada por Mitógeno

MBT: Maquinaria basal de transcripción

MEK: Cinasa de MAPK

NLS: Sitios de localización nuclear

P<sub>4</sub>: Progesterona

PI3-K: Cinasa de Inositol Trifosfato

PKA: Proteína Cinasa A

PKC: Proteína Cinasa C

PLC: Fosfolipasa C

PP1: Fosfatasa 1

PP2A: Fosfatasa 2A

PTK: Proteína de Tirosina Cinasa

RGABA<sub>A</sub>: Receptor a GABA tipo A

RP: Receptor a progesterone intracelular

RP-A: Isoforma A del receptor a progesterona

RP-B: Isoforma B del receptor a progesterona

SMRT: Silenciador mediador de los receptores a hormonas tiroideas y ácido retinoico

Sp-1: Proteína específica 1

SRC-1: Coactivador de receptores a esteroides-1

TGF- $\alpha$ : Factor de crecimiento tumoral - $\alpha$

TGF- $\beta$ : Factor de crecimiento tumoral- $\beta$

UBA: Enzima activadora de ubiquitina

UBC: Enzima conjugadora de ubiquitina

UBL: Enzima ligasa de ubiquitina



**XIII. REFERENCIAS**

- Assimakopoulou M, Sotitopoulou B, Maraziotis T, Varakis. 1998. Does sex steroid receptor status have any prognostic or predictive significance in brain astrocytomas tumors? *Clin Neuropathol.* 17:27-34.
- Batistatou A, Stefanou D, Goussia A, Arkoumani E, Papavassiliou A G, Agnatis N J. 2004. Estrogen receptor beta (ER-beta) is expressed in brain astrocytic tumors and declines with dedifferentiation of the neoplasm. *J Cancer Res Clin. Oncol.* 130:405-410.
- Beck C, Weigel N, Edwards D. 1992. Effects of hormone and cellular modulators of protein Phosphorylation on transcriptional activity, DNA binding and Phosphorylation of human progesterone receptors. *Mol Endocrinol.* 6:607-620.
- Brentani M M, Lopes M T, Martinis V R, Plese J P. 1984. Steroid receptors in intracranial tumors. *Clin Neuropharmacol.* 7: 347-350.
- Blaauw G, Koudstaal J, Blankenstein M A, Debets-Te B M, Gijzen H A. 1995. Progesterone receptors in meningiomas. Comparison of cytosolic assays with immunocytochemical identification in cryostat and paraffin sections. *Acta Neurochir.* 134: 83-87.
- Blankenstein M A, Blaauw G , Lamberts S W, Mulde E. 1983. Presence of progesterone receptors and absence of oestrogen receptors in human intracranial meningioma cytosols. *Eur J Cancer Clin Oncol.* 19: 365-370.
- Blankenstein M A, Koehorst S G, van der Kallen C J, Jacobs H M, van Sriel A B, Donker G H, van't Verlaat J W, Blaauw , Thejssen J H. 1995. Oestrogen receptor independent expression of progesterone receptors in human meningiomas. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 53: 361-365.
- Brandis A, Mirzai S, Tatagiba M, Walter G F, Samii M, Ostertag H. 1993. Immunohistochemical detection of female sex hormone receptors in meningiomas: correlation with clinical and histological features. *Neurosurgery.* 33: 212-217.
- Brentani M M, Lopes M T, Martins V R, Plese J P. 1984. Steroid receptors in intracranial tumors. *Clin Neuropharmacol.* 7:347-350.
- Bouillot P, Pelliser J, Devictos B. 1994. Quantitative imaging of estrogen and progesterone receptor, estrogen-regulated protein and growth factor: Immunocytochemical assay in 52 meningiomas. Correlation with clinical and morphological data. *J Neurosurgery.* 81:756-773.

- Bozzetti C, Camisa R, Nizzoli R, Manotti L, Guazzi A, Naldi N, Mazza S, Nizzoli V, Cocconi G. 1995. Estrogen and progesterone receptors in human meningiomas: biochemical and immunocytochemical evaluation. *Surg Neurol.* 43: 230-233.
- Camacho-Arroyo I. 2003. Progesterone receptor isoforms and progesterone actions in the brain. In Gayathri A (ed) *Recent Research Developments in Life Sciences*. Research Signpost. Kerala. pp.221-242.
- Camacho-Arroyo I, Guerra-Araiza C, Cerbón M A, 1998. Progesterone receptor isoforms are differentially regulated by sex steroids in the rat forebrain. *Neuroreport* 9: 3993-3996.
- Camacho-Arroyo I, González-Agüero G, Gamboa-Domínguez A, Cerbón M A, Ondarza R. 2000. Progesterone receptor isoforms expression pattern in human chordomas. *J Neuro-Oncol.* 49: 1-7.
- Camacho-Arroyo I, Pasapera A, Cerbón M A. 1996. Regulation of progesterone receptor gene expression by sex steroid hormones in the hypothalamus and the cerebral cortex of the rabbit. *Neurosci Lett.* 214:25-8.
- Camacho-Arroyo I, Pasapera A, Pérez-Palacios G, Cerbón M A. 1995. Progesterone and its metabolites in central nervous system function. *Rev Invest Clin.* 47: 329-240.
- Camacho-Arroyo I, Rodríguez-Dorantes M. 2006. Transcriptional activity regulated by progesterone receptor isoforms. . In Gayathri A (ed) *Recent Research Developments in Life Sciences*. Research Signpost. Kerala. pp.25-38.
- Camacho-Arroyo I, Ruiz A, Gamboa-Domínguez A, Pérez-Palacios G, Cerbón M A. 1994. Immunohistochemical localization of intracellular progesterone and glucocorticoid receptors in the rabbit lung. *J Endocrinol.* 142: 311-316.
- Camacho-Arroyo I, Villamar-Cruz O, González-Arenas A, Guerra-Araiza C. 2002. Participation of the 26S proteasome in the regulation of progesterone receptor concentrations in the rat brain. *Neuroendocrinol.* 76: 267-271.
- Carroll R S, Brown M, Zhang J, DiRenzo J, Font De Mora J, McL. Black. P. 2000. Expression of a subset of steroid receptor cofactors is associated with progesterone receptor expression in meningiomas. *Clinical Cancer Research.* 6: 3570–3575.
- Carroll R S, Zhang J, Dashner K, Sar M, Black P M. 1993. Progesterone receptor expression in meningiomas. *Cancer Res.* 53: 1312-1316.
- Carroll R S, Zhang J, Dashner K, Sar M, Black P M. 1995. Steroid hormone receptors in astrocytic neoplasms. *Neurosurgery.* 37: 496-504.

- Christensen K, Estes P A, Onate S A, Beck C A, DeMarzo A, Altman M, Liberman B A, St John J, Nordeen S K, Edwards D P. 1991. Characterisation and functional properties of the A and B forms of human progesterone receptors synthesized in a baculovirus system. *Mol Endocrinol*. 5: 1755-1770.
- Clarke C. 1993. Ovarian steroid hormone receptors and their mechanism of action. In: *Molecular Aspects of Placental and Fetal Autacoids*. Rice G E, Brennecke S P (eds). CRC Press, Inc., Boca Raton, FL, pp 27-54.
- Clemm D L, Macy B L, Santiso-Mere D, McDonnell D P. 1995. The critical cellular components which distinguish between hormone and antihormone activated progesterone receptor. *J Steroid Biochem Molec Biol*. 53: 487-495.
- Dalkin A C, Paul S J, Haisenleder D J, Ortolano G A, Yasin M, Marshall J C. 1992. Gonadal steroids effect similar regulation of gonadotrophin subunit mRNA expression in both male and female rats. *J Endocrinol*. 132: 39-45.
- Danner L, Weigel N, Maxwell B, Schrader W T and O'Malley B. 1990. Regulation of progesterone receptor-mediated transcription by phosphorylation. *Science*. 250: 1740-1743.
- Donnell M S, Meyer G A, Donegan W L. 1979. Estrogen-receptor protein in intracranial meningiomas. *J Neurosurg*. 50: 499-502.
- Duffy M D, Wells T R, Haluska J G, Stouffer R L. 1997. The ratio of progesterone receptor isoforms changes in the monkey corpus luteum during the luteal phase of the menstrual cycle. *Biol Reprod*. 57: 693-699.
- Favre B, Turowski, Hemmings B. 1997. Differential inhibition and posttranslational modification of protein phosphatase 1 and 2A in MCF7 cells treated with caliculin-A, okadaic acid and tautomycin. *J Biol Chem*. 272: 13856-13863.
- Fujimoto J, Ichigo S, Reiko H, Sakaguchi H, Tamaya T. 1997. Clinical implication of expression of progesterone receptor A and B mRNA in secondary spreading of gynecologic cancers. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 62: 449-454.
- Gao X, Loggie B W, Nawaz Z. 2002. The roles of sex steroid receptor coregulators in cancer. *Mol Cancer*. 14: 1-7.
- Gheringer M. M. 2004. Microcystin-LR and okadaic acid- induced cellular effects: a dualistic response. *FEBS*. 577: 1-8
- Giangrande P, Pollio G, McDonnell D. 1997. Mapping and characterization of the functional domains responsible for the differential activity of the A and B isoforms of the human progesterone receptor. *J Biol Chem*. 272: 32889-32900.

- Giangrande P, McDonnell D. 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.
- González-Agüero G, Ondarza R, Gamboa-Domínguez A, Cerbón M A, Camacho-Arroyo I. 2001. Progesterone receptors isoforms expresión pattern in human astrocytomas. *Brain Res Bull.* 56: 43-48.
- González-Morán G, Camacho-Arroyo I, 1998. Histomorphometric and progesterone receptor immunohistochemical analysis in the oviduct of newly hatched chicks treated with follicle-stimulating hormone during embryonic development. *Anat Histol Embryol.* 27: 277-282.
- Gore-Langton R. 1988. Cyclosporine differentially affects estrogen and progestin synthesis by rat granulosa cells in vitro. *Mol Cell Endocrinol.* 57: 187-198.
- Gorosope W C, Freeman M E. 1985. Effects of placenta and maternal serum on prolactin secretion in vitro. *Biol Reprod.* 32: 279-283.
- Gould E, Woolley C S, Frankfurt M, McEwen B S. 1990. Gonadal steroids regulate dendritic spine density in hippocampal pyramidal cells in adulthood. *J Neurosci.* 10: 1286-91.
- Graham J D, Yeates C, Balleine R L, Harvey S S, Milliken J S, Bilous A M, Clarke C L. 1995. Characterization of progesterone receptor A and B expression in human breast cancer. *Cancer Res.* 55: 5063-5068.
- Graham J and Clarke C. 1997. Physiological action of progesterone in target tissues. *Endocr Rev* 18:502-519.
- Grumberg S M, Daniel A M, Muensh H, Daniels J R, Bersntein L, Kortes V, Weiss M H. 1987. Correlation of meningioma hormone receptor status with hormone sensitivity in tumor stem cell assay. *J Neurosug.* 66: 405-408.
- Grumberg S M, Weiss M H, Ahmadi J, Sadum A, Russell C A , Lucci L, Stevensom L L. 1991. Treatment of unrescatable meningiomas with the antiprogestone agent mifepristone. *J Neurosurg.* 74: 861-866.
- Guerra-Araiza C y Camacho-Arroyo I, 2000 Progesterone receptor isoforms: function and regulation. *Rev In Clin.* 52: 686-691.
- Guerra-Araiza C, Reyna-Neyra A, Salazar A M, Cerbón M A, Morimoto S, Camacho-Arroyo I. 2001. Progesterone receptor isoforms expression in the prepuberal and adult male rat brain. *Brain Res Bull.* 54: 13-17.

- Guerra-Araiza C, Villamar-Cruz O, González-Arenas A, Chavira R, Camacho-Arroyo I. 2003. Changes in progesterone receptor isoforms content in the rat brain during the oestrous cycle and after estradiol and progesterone treatments. *J Neuroendocrinol.* 15: 1-7.
- Halper J, Colvard D S, Scheithauer B W, Jiang N S, Press M F, Graham M L, Riehl E, Laws E R Jr, Spelberg T C. 1989. Estrogen and progesterone receptors in meningiomas: comparison of nuclear binding, dextran charcoal, and immunoperoxidase staining assays. *Neurosurgery.* 25: 546-552.
- Hayward E, Whitwell H, Paul K S, Barnes D M. 1984. Steroid receptors in human meningioma. *Clin Neuropharmacol.* 7(4):351-356.
- Ho S M. 2003. Estrogen, progesterone and epithelial ovarian cancer. *Reprod Biol and Endocrinol.* 1:73.
- Honegger J, Renner C, Fahlbusch R, Adams E F. 1997. Progesterone receptor gene expression in craniopharyngiomas and evidence for biological activity. *Neurosurgery.* 41: 1359-1363.
- Hsue A J, Adashi E Y, Jones P B, Welsh TH Jr. 1984. Hormonal regulation of the differentiation of cultured ovarian granulosa cells. *Endocr Rev.* 5: 76-127.
- Hurd C, Khatteree N, Alban P, Nag K, Jhanwar S C, Dinda S, Moudgil V K. 1995. Hormonal regulation of the p53 tumor suppressor protein in T47-D human breast carcinoma cell line. *J Biol Chem.* 270: 28507-28510.
- Huse B, Verca SB, Matthey P, Rusconi S. 1998. Definition of a negative modulation domain in the human progesterone receptor. *Mol Endocrinol.* 12: 1334-1342.
- Hutchison J S, Nelson P B, Zeleznik A J. 1986. Effects of different gonadotropin pulse frequencies on corpus luteum function during the menstrual cycle of rhesus monkeys. *Endocrinology.* 119: 1964-1971.
- Ignar-Trowbridge D M, Nelson K G, Bidwell M C, Curtis S W, Washburn T F, McLachlan J A, Korach K S. 1992. Coupling of dual signaling pathways: epidermal growth factor action involves the estrogen receptor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 89: 4658-4662.
- Ing N H, Beekman J M, Kessler D J, Murphy M, Jayaraman K, Zendegui J G, Hogan M E, O'Malley B W, Tsai M J. 1993. In vivo transcription of a progesterone responsive gene is specifically inhibited by a triplex-forming oligonucleotide. *Nucleic Acids Res.* 21: 2789-9276.

- Ilenchuck T, Walters M. 1987. Rat uterine progesterone receptor analyzed by [3H]R5020 photoaffinity labeling, evidence that A and B subunits are not equimolar. *Endocrinol.* 120: 1449-1456.
- Ironside J W, Battersby R D, Dangerfield V J, Timperley W R, Underwood J C. 1986. Progesterone receptors in meningiomas: morphometric assessment of vascularity and cellularity on near facsimile cryostat section. *J Clin Pathol.* 39: 810-811.
- 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.
- Kato J, Hirata S, Nozawa A, Mouri N. 1993. The ontogeny of gene expression of progesterone receptors in the female rat brain. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 47: 173-182.
- Kazmi S, Visconti V, Plante R, Ishaque A and Lau C. 1993. Differential Regulation of human progesterone receptor A and B form-mediated trans-activation by phosphorylation. *Endocrinology* 3: 1230-1238.
- Keen J , Zhou Q, Park B, Pettit C, Mack K, Blair B, Brenner K, Davison N. 2005. Protein Phosphatase 2A regulates Estrogen receptor  $\alpha$  (ER) expression through modulation of ER mRNA stability. *J Biol Chem.* 180: 29519-29524.
- Kepes J J. 1982. Meningiomas: biology and differential diagnosis. In G Masson (ed). *Masson monographs in diagnostic pathology* 4. pp. 1-18. Plenum. New York.
- Khalid H. 1994. Immunohistochemical study of estrogen receptor-related antigen, progesterone and estrogen receptors in human intracranial meningiomas. *Cancer.* 74: 679-685.
- Khalid H, Shibata S, Kishicawa M, Yasunaga A, Iseki M, Hiura T. 1997. Immunohistochemical analysis of progesterone receptor and Ki-67 labeling index in astrocytic tumors. *Cancer.* 80: 2133-2140.
- Khan S, Abdelrahim M, Samudio I, Safe S. 2003. Estrogen receptor/Sp1 complexes are required for induction of cad gene expression by 17 $\beta$ -estradiol in breast cancer cells. *Endocrinology.* 144: 2325-2335.
- Knotts T, Orkiszewski R, Cook RG, Edwards D, Weigel N. 2001. Identification of a phosphorylation site in the hinge region of the human progesterone receptor and additional amino-terminal phosphorylation sites. *J Biol Chem.* 276: 8475-8483.

- Kontula K, Janne O, Vihko R, de Jager E, de Visser J, Zeelen F. 1975. Progesterone-binding proteins: in vitro binding and biological activity of different steroidal ligands. *Acta Endocrinol (Copenh)*. 78: 574-92.
- Kraus W L, Katzenellenbogen B S. 1993a. Regulation of progesterone receptor gene expression and growth in the rat uterus: modulation of estrogen actions by progesterone end sex steroid hormone antagonists. *Endocrinology*. 132: 2371-2396.
- Kraus W L, Montano M M, Katzenellenbogen B S. 1993b. Cloning of the rat progesterone receptor gene 5'-region and identification of two functionally distinct promoters. *Mol Endocrinol*. 7: 1603-1616.
- Lanari C, Molinolo A. A. 2002. Progesterone receptors – animal models and cell signalling in breast cancer Diverse activation pathways for the progesterone receptor: possible implications for breast biology and cancer. *Breast Cancer Res*. 4: 240-243.
- Lange C. 2004. Making Sense of cross-talk between steroid hormone receptors and intracellular signaling pathways: who will have the last word? *Mol Endocrinol*. 18: 269-278.
- Lange C, Shen T, Horwitz K. 2000. 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*. 97: 1032-1037.
- Leonhardt S A, Altmann M, Edwards D P. 1998. Agonist and antagonists induce homodimerization and mixed ligand heterodimerization of human progesterone receptors in vivo by a mammalian two-hybrid assay. *Mol Endocrinol*. 12: 1914-1930.
- Loosfelt H, Atger M, Misrahi M, Guiochon-Mantel A, Meriel C, Logeat F, Benarous R, Milgrom E. 1986. Cloning and sequence analysis of rabbit progesterone-receptor complementary DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*. 83: 9045-9049.
- Lu Q, Surks H, Ebling H, Baur W, Brown D, Pallas D and Karas H. 2003 Regulation of estrogen receptor  $\alpha$ - mediated transcriptional by a direct interaction with protein phosphates 2A. *J Biol Chem*. 278: 4639-4645.
- Magrassi L, Bono F, Milanese G, Butti G. 1992. Vitamin D receptor expression in human brain tumors. *J Neurosurg Sci*. 36: 27-30
- Mangal R K, Wiehle R D, Poindexter A N, Weigel L N. 1997. Differential expression of uterine progesterone receptors forms A and B during the menstrual cycle. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 63: 195-202.

- Markwalder T M, Zava D T, Goldhirsch A, Markwalder R V, Masson E A. 1983. Estrogen and progesterone receptors in meningiomas in relation to clinical and pathologic features. *Surg Neurol.* 20: 42-47.
- Mendoza-Rodríguez C A, Camacho-Arroyo I, García G A, Cerbón M A. 1999. Variations of progesterone receptor and c-fos gene expression in the rat uterus after treatment with norethisterone and its A-ring reduced metabolites. *Contraception.* 59: 339-343.
- Michelsen J J, New P F. 1969. Brain tumor and pregnancy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 32: 305-307.
- Misrahi M, Venebcie P Y, Saugier-veber P, Sar S, Dessen P, Milgrom E. 1993. Structure of the human progesterone receptor gene. *Biochem Biophys Acta.* 216: 298-292.
- Mote P A, Balleine R L, McGowan E M, Clarke C L. 1999. Colocalization of progesterone receptors A and B by dual immunofluorescent histochemistry in human endometrium during the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab.* 84: 2963-2971.
- Mukherjee K, Syed V, Ho S M. 2005. Estrogen-induced loss of progesterone receptor expression in normal and malignant ovarian surface epithelial cells. *Oncogene.* 24: 4388–4400.
- Mumb M, Walter G. 1993. Protein serine/threonine phosphatases: structure, regulation, and functions in cell growth. *Amer Physiol Soc.* 73:673-699.
- Musgrove E A, Lee C S, Sutherland R L. 1991. Progestins both stimulate and inhibit breast cell cycle progression while increasing expression of transforming growth factor  $\alpha$ , epidermal growth factor receptor, c-fos and c-myc genes. *Mol Cell Biol.* 11: 5032-5043.
- Musgrove E A, Hamilton J A, Lee C S, Sweenwy K J, Watts C K, Sutherland R L. 1993. Growth factor, steroid, and steroid antagonist regulation on cyclin gene expression associated with changes in T47-D human breast cancer cell progression. *Mol Cell Biol.* 13: 3577-3587.
- Murphy L J, Sutherland R L, Stead B, Murphy L C, Lazarus L. 1986. Progestin regulation of epidermal growth factor receptor in human mammary carcinoma cells. *Cancer Res.* 46: 728-734.
- Mulac-Jericevic B, Mullinax R A, De Mayo F J, Lydon J P, Conneely O M. 2000. Subgroup of reproductive functions of progesterone mediated by progesterone receptor-B isoform. *Science.* 289: 1751-1754.



- Nardulli A M, Romine L E, Carpo C, Greene G L, Rainish B. 1996. Estrogen receptor affinity and location of consensus and imperfect estrogen response elements influence transcription activation of simplified promoters. *Mol Endocrinol*.10: 694-704.
- Prieto A, Villamar-Cruz O, Saqui-Salces M, Neri-Gómez T, Almaraz-Nieves A, Hernández-Molina V I, Valdez Rodríguez H, Camacho-Arroyo I. 2003. ¿Cómo actúan las hormonas esteroides? *Edu Quím* 14: 196-201.
- Paoletti P, Tutti G, Zibera C, Scerrati M, Gibelli N, Roselli R, Magrassi L, Sica G, Rossi G, Robustelli Della Cuna G. 1990. Características and biological role of steroid hormone receptors in neuroepithelial tumors. *J Neurosurg*. 73: 736-742.
- Pérez-Palacios. 1985. Mecanismos de acción de hormonas esteroides en bioquímica e inmunología. Vol 2. Cap VI, Ed. Hicks, J y Díaz-Agaya J.C. UNAM. México. 346-370.
- Perrot-Applanat M, David-Ferreira J F. 1982. Immunocytochemical localization of progesterone-binding protein (PBP) in guinea-pig placental tissue. *Cell Tissue Res*. 223: 1511-1519.
- Pierson-Mullany L K, Lange C A. 2004. Phosphorylation of progesterone receptor serine 400 mediates ligand-independent transcriptional activity in response to activation of cyclin-dependent protein kinase 2. *Mol. Cell Biol*. 24: 10542-10557.
- Pliskow S, Herbst S J, Saiontz H A, Cove H M, Ackerman R T. 1995. Inhibition of growth of human malignant glioma cell line (U87MG) by the steroid hormone antagonist RU486. *J Clin Endocrinol Metab*. 77: 1388-1392.
- Poisson M, Pertuiset B F, Hauw J J, Philippon J, Buge A, Moguilewsky M, Philibert D. 1983. Steroid hormone receptors in human meningiomas, gliomas and brain metastases. *J Neurooncol*. 1: 179-189.
- Press M F, Greene G L. 1988. Localization of progesterone receptor with monoclonal antibodies to the human progestin receptor. *Endocrinology*. 122: 1165-1175.
- Renwick A G. 1970. Metabolism and function of ovarian and testicular hormones. *J Reprod Fertil Suppl*. 12:55-64.
- Richer J K, Jacobsen B M, Manning N G, Abel M G, Wolf D M, Horwitz K B. 2002. Differential gene regulation by the two progesterone receptor isoforms in human breast cancer cells. *J Biol Chem*. 277: 5209-5218.

- Rogatsky I, Trowbridge J M, Garabedian M J. 1999. Potentiation of human estrogen receptor alpha transcriptional activation through phosphorylation of serines 104 and 106 by the cyclin A-CDK2 complex. *J Biol Chem.* 274: 22296-22302.
- Rotchild I. 1983. Role of progesterone in initiating and maintaining pregnancy. In: Bardin C W, Milgrom E, Mauvais-Jarvis P (eds) *Progesterone and progestins.* Raven Press, New York, pp 219-229.
- Rowan B, Garrison N, Weigel N L, O'Malley B W. 2000. 8-bromo-cyclic AMP induces phosphorylation of two sites in SRC-1 that facilitate ligand-independent activation of the chicken progesterone receptor and are critical for functional cooperation between SRC-1 and CREB binding protein. *Mol Cell Biol.* 20: 8720-8730.
- Sakamoto H, Ukena K, Tsutsui K. 2001. Effects of progesterone synthesized de novo in the developing Purkinje cell on its dendritic growth and synaptogenesis. *J Neurosci.* 21: 6221-32.
- Salvatori L, Pallante P, Ravenna L, Chinzari P, Frati L, Russo M A, Petrangeli E. 2003. Oestrogens and selective oestrogen receptor (ER) modulators regulate EGF receptor gene expression through human ER alpha and beta subtypes via an Sp1 site. *Oncogene.* 22: 4875-4881.
- Sartorius C, Groshong S, Miller L, Powell R, Tung L, Takimoto G, Horwitz K. 1994a. New T47-D breast cancer cell lines for the independent study of progesterone B and A receptors: only antiprogestin occupied B receptors are switched to transcriptional agonist by cAMP. *Cancer Res.* 54: 3868-77.
- Sartorius C, Melvilla M, Hovland AI, Tung L, Takimoto G, Horwitz C. 1994b. A third transactivation function (AF3) of human progesterone receptor located in the unique N-terminal segment of the B-isoform. *Mol Endocrinol* 10: 1174-1159.
- Savouret J, Misrahi M, Milgrom E. 1990. Molecular action of progesterone. *J Biochem.* 22: 579-94.
- Shen T, Horwitz K, Lange C. 2001. Transcriptional hyperactivity of human progesterone receptors is coupled to their ligand-dependent down-regulation by mytogen-activated protein kinase-dependent phosphorylation of serine 294. *Mol Cell Biol.* 21: 6122-6131.
- Schairer C. 2002. Progesterone receptors – animal models and cell signalling in breast cancer Implications for breast cancer of inclusion of progestins in hormone replacement therapies. *Breast Cancer Res.* 4: 244-8.

- Sheridan P L, Evans R M, Horwitz K B. 1989. Phosphotryptic peptide analysis of human progesterone receptor. New phosphorylated sites formed in nuclei after hormone treatment. *J Biol Chem* 264: 6520-6528.
- Sorva A, Risteli J, Risteli L, Valimaki M, Tilvis R. 1991. Effects of vitamin D and calcium on markers of bone metabolism in geriatric patients with low serum 25-hidroxitamin D levels. *Calcif Tissue Int.* 49 Suppl:S88-9.
- Speirs V, Boyle-Walsh E, Fraser W D. 1997. Constitutive co-expression of estrogen and progesterone receptor mRNA in human meningiomas by RT-PCR and response of in vitro cell cultures to steroid hormones. *Int J Cancer.* 72: 714-719.
- Stojkovic R R, Jovancevic M, Santel D J, Grcevic N, Gamulin S. 1992. Sex steroid receptor in intracranial tumors. *Cancer.* 65: 1968-1970.
- Susuki T, Sasano H, Kimura N, Tamura M, Fukaya T, Yajima A, Nagura H. 1994. Immunohistochemical distribution of progesterone, androgen and oestrogen receptors in the human ovary during the menstrual cycle: relationship to expression of steroidogenic enzymes. *Hum Reprod.* 9: 1589-1595.
- Szabo M, Kilen S M, Nho S J, Schwartz N B. 2000. Progesterone receptor A and B messenger ribonucleic acid levels in the anterior pituitary of rats are regulated by estrogen. *Biol Reprod.* 62: 95-102.
- Sugiyama M, Imai A, Furui T, Tamaya T. 2003. Membrane-associated serine/threonine protein phosphatase in endometrial cancer. *Am J Obstet Gynecol.* 189: 1666-1669.
- Takimoto G, Horwitz K. 1993. Progesterone receptor phosphorylation- complexities in defining a functional role. *Trends Endocrinol Metabol.* 4: 1-17.
- Theveny B, Bailly A, Rauch C, Rauch M, Delain E, Milgrom E. 1987. Association of DNA-bound progesterone receptors. *Nature.* 329: 79-81.
- Topper Y, Freeman C. 1980. Multiple hormone interactions in the developmental biology of the mammary gland. *Physiol Rev.* 60: 1049-1106.
- Tung L, Mohamed M K, Hoeffler J P, Takimoto G S, Horowitz K B. 1993. Antagonist-occupied human progesterone B-receptors activate transcription without binding to progesterone response elements and are dominantly inhibited by A-receptors. *Mol Endocrinol.* 7: 1256-1265.
- Turgeon J L, Waring D W. 2000. Progesterone regulation of the progesterone receptor in rat gonadotropes. *Endocrinology.* 141: 3422-9.

- Ugi S, Imamura T, Ricketts W, Olefsky J. 2002. Protein phosphatase 2A forms a molecular complex with Shc and regulates Shc tyrosine phosphorylation and downstream mitogenic signaling. *Mol Cell Biol.* 22: 2375-2387.
- Ukena K, Kohchi C, Tsutsui K. 1999. Expression and activity of 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta5-delta4-isomerase in the rat Purkinje neuron during neonatal life. *Endocrinology.* 140: 805-813.
- Vegeto E, Shahbaz M M, Wen D X, Goldman M E, O'Malley B W, McDonnell D P, 1993. Human progesterone receptor A form is a cell- and promoter-specific repressor of human progesterone receptor B function. *Mol Endocrinol.* 7: 1244-1255.
- Villamar-Cruz O, Manjarrez-Marmolejo J, Alvarado R, Camacho-Arroyo I. 2006 Regulation of the content of progesterone and estrogen receptors, and their cofactors SRC-1 and SMRT by the 26S proteasome in the rat brain during the estrous cycle. *Brain Res Bull.* 69: 276-81.
- Vongher J, Frye C. 1999. Progesterone in conjunction with estradiol has neuroprotective effects in an animal model of neurodegeneration. *Pharmacol Biochem Behav.* 64: 777-785.
- Weigel N. 1996. Steroid hormone receptors and their regulation by phosphorylation. *Biochem J.* 319: 657-667.
- Weisz J, Ward I L. 1980. Plasma testosterone and progesterone titers of pregnant rats, their male and female fetuses, and neonatal offspring. *Endocrinology.* 106: 306-316.
- Wen D X, Xu Y F, Mais D E, Goldman M E, McDonnell D P. 1994. The A and B isoforms of the human progesterone receptor operate through distinct signaling pathways within target cells. *Mol Cell Biol.* 14: 8356-8364.
- Wong M S J, Murphy L C. 1991. Differential regulation of c-myc by progestins and antiestrogens in T47-D human breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 39:39-44.
- Yang F, Gao X, Leonard D M, Nawaz Z. 2003. Specific ubiquitin-conjugation enzymes promote degradation of specific nuclear coactivators. *Mol Endocrinol.* 17: 1315-1331.
- Zwain I H, Yen S S. 1999. Neurosteroidogenesis in astrocytes, oligodendrocytes, and neurons of cerebral cortex of rat brain. *Endocrinology.* 140: 3843-3852.
- Zhang Y, Bai W, Allgood V, Weigel N. 1994. Multiple signaling pathways activate the chicken progesterone receptor. *Mol Endocrinol.* 8:577-584.

- Zhang Y, Beck C A, Poletti A, Edwards D P, Weigel N L. 1995. Identification of a group of Ser-Pro motif hormone-inducible phosphorylation sites in the human progesterone receptor. *Mol Endocrinol.* 9: 1029-1040.
- Zhang Y, Beck C A, Poletti A, Clement J P 4th, Prendergast P, Yip T T, Hutchens T W, Edwards D P, Weigel N L. 1997. Phosphorylation of human progesterone receptor by cyclin-dependent kinase 2 on three sites that are authentic basal phosphorylation sites in vivo. *Mol Endocrinol.* 11: 823-832.