



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

UNAM
POSGRADO

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN
CIENCIAS BIOQUÍMICAS

**PAPEL DE LA METILACIÓN EN LA REGULACIÓN DE LA
EXPRESIÓN DE LAS ISOFORMAS A Y B DEL RECEPTOR A
PROGESTERONA EN LÍNEAS CELULARES DE
ASTROCITOMAS HUMANOS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)

P R E S E N T A:
BIÓL. VALERIA HANSBERG PASTOR

DIRECTOR DE TESIS: DR. IGNACIO CAMACHO ARROYO



México, D.F.,

2011



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.



PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

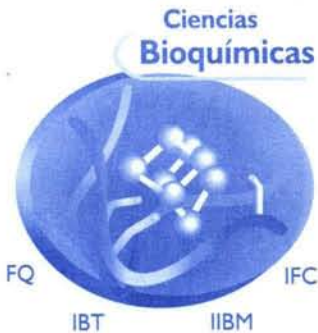
**A LOS MIEMBROS DE
JURADO DE EXAMEN**

Por medio del presente manifiesto que he revisado el texto que será sometido a su consideración del(a) alumno (a) de Maestría en Ciencias Bioquímicas BIÓL. VALERIA HANSBERG PASTOR titulado:

"Papel de la metilación en la regulación de la expresión de las isoformas A y B del receptor a progesterona en líneas celulares de astrocitomas humanos"

ATENTAMENTE


**DR. IGNACIO CAMACHO ARROYO
TUTOR**



PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

Of. No. PMDCB/528/2011

BIÓL. VALERIA HANSBERG PASTOR
Alumna de la Maestría en Ciencias Bioquímicas
P r e s e n t e

Los miembros del Subcomité Académico, en reunión ordinaria del día 13 de Junio del presente año, conocieron su solicitud de reasignación de JURADO DE EXAMEN para optar por el grado de MAESTRA EN CIENCIAS (BIOQUIMICA), con la tesis titulada "**Papel de la metilación en la regulación de la expresión de las isoformas A y B del receptor a progesterona en líneas celulares de astrocitomas humanos**", dirigida por el Dr. Ignacio Camacho Arroyo.

De su análisis se acordó nombrar el siguiente jurado:

PRESIDENTE	Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes
VOCAL	Dr. Julio Morán Andrade
SECRETARIO	Dr. Angel Zarain Herzberg
SUPLENTE	Dra. María Elena Ibarra Rubio
SUPLENTE	Dra. Elizabeth Langley McCarron

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 16 de Junio de 2011.
EL COORDINADOR DE ENTIDAD


DR. ROGELIO RODRÍGUEZ SOTRES

C.c.p. Archivo

RRS*lgg

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis se realizó en el Departamento de Biología de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México bajo la dirección del Dr. Ignacio Camacho Arroyo y con el apoyo económico del proyecto 100645 de CONACYT.

La supervisión técnica de este trabajo fue realizada por la Dra. Aliesha Araceli González Arenas del Departamento de Biología de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El comité tutorial que asesoró el desarrollo de este trabajo estuvo formado por la Dra. Martha Robles Flores y la Dra. Elizabeth Langley McCarron.

El jurado de Examen de Maestría estuvo constituido por:

Presidente: Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes

Vocal: Dr. Julio Morán Andrade

Secretario: Dr. Ángel Zarain Herzberg

Suplente: Dra. María Elena Ibarra Rubio

Suplente: Dra. Elizabeth Langley McCarron

ÍNDICE

I. Índice de abreviaturas	1
II. Resumen	2
III. Introducción	3
IV. Antecedentes	4
4.1. Características generales de los astrocitomas.....	4
4.2. Efectos y mecanismos de acción de la progesterona.....	7
4.3. Estructura y función del receptor a progesterona	9
4.4. Regulación de la expresión del gen del receptor a progesterona	14
4.5. La metilación del DNA.....	19
4.6. Regulación por metilación de la expresión del receptor a progesterona en cáncer.....	22
4.7. Papel de la progesterona y sus receptores en el crecimiento de los astrocitomas.....	26
V. Planteamiento del problema	28
VI. Hipótesis	28
VII. Objetivos	29
VIII. Metodología	29
8.1. Cultivo de líneas celulares.....	29
8.2. Tratamiento con 5-aza-2'-deoxicitidina (5Aza).....	30
8.3. Extracción de RNA y expresión del RP.....	31
8.4. Extracción de proteínas y Western Blot.....	31
8.5. Determinación del número celular.....	33
8.6. Análisis estadístico.....	33
IX. Resultados	34
9.1. Papel de la metilación en la expresión del RP en las líneas celulares U373 y D54.....	34

9.2. Efecto de la P4 y la 5Aza sobre la proliferación de las células U373 y D54.....	38
X. Discusión.....	42
XI. Conclusiones.....	47
XII. Perspectivas.....	48
XIII. Referencias.....	49
XIV. Anexo.....	57

Camacho-Arroyo, I., V. Hansberg-Pastor, E. Cabrera-Muñoz, O. T. Hernández-Hernández, and A. González-Arenas. 2011. Role of Progesterone Receptor Isoforms in Human Astrocytomas Growth, chapter 6 in *Tumors of the Central Nervous System*. Cynthia Kroonen (Ed.). Springer, USA. Vol. 5.

I. ÍNDICE DE ABREVIATURAS

3'UTR: región 3' no traducida

5Aza: 5-aza-2'-deoxicitidina

AF: función de activación

AP-1: proteína activadora 1

DBD: dominio de unión al DNA

DNMT: metiltransferasa de DNA

CpG: dinucleótido conformado por una citocina y una guanina

E2: estradiol

ERE: elemento de respuesta a estrógenos

ERP: elemento de respuesta a progesterona

Fos: homólogo del oncogen viral FBJ de osteosarcoma murino

HDAC: desacetilasa de histonas

IF: función de inhibición

Jun: proto-oncogen jun

LBD: dominio de unión al ligando

MBD: proteína con dominio de unión a CpG metilados

MeCP: proteína de unión a CpG metilados de la familia de las MBD

MGMT: O6-metil-metiltransferasa de guanina

NLS: secuencia de localización nuclear

P4: progesterona

RE: receptor a estrógenos

RP: receptor a progesterona

Sp1: proteína específica 1

SRC: coactivador de receptores a esteroides

II. RESUMEN

La progesterona (P4) 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 estos tumores se ha encontrado una relación directa entre el contenido del RP y el grado de evolución del tumor, por lo que se ha propuesto al gen del RP como un marcador molecular de cáncer. El gen del RP codifica para dos isoformas (RP-A, 94 kDa y RP-B, 116 kDa), las cuales se expresan de manera tejido específico. Diversos estudios han encontrado que la expresión de las isoformas se ve alterada en distintos tipos de cáncer y que esta expresión diferencial puede estar mediada por mecanismos de metilación de la región promotora del gen del RP. Sin embargo, se desconoce si en líneas celulares de astrocitomas humanos la expresión alterada de las isoformas del RP se debe a mecanismos de metilación. En el presente trabajo se determinó el efecto del agente hipometilante 5-aza-2'deoxicitidina (5Aza) en la expresión del RP en dos líneas celulares derivadas de astrocitomas humanos grado III (U373) y grado IV (D54) por medio de RT-PCR y Western blot. El tratamiento con 5Aza incrementó la expresión del RNA mensajero y de la proteína de la isoforma RP-B en la línea U373, pero no en la línea D54. La expresión de RP-A no se incrementó en ninguna de las dos líneas celulares al tratar las células con 5Aza. También se estudió si la inducción de la expresión del RP por 5Aza tenía un efecto en el crecimiento de las células. El tratamiento con P4 (10 nM) incrementó el número de células de ambas líneas, mientras que los tratamientos con 5Aza y P4+5Aza lo redujeron. Estos resultados nos sugieren que en la línea celular U373 existe una regulación de la expresión de RP-B por metilación y que ésta se pierde en una línea celular derivada de un tumor de mayor grado de evolución. La hipometilación inducida por 5Aza redujo el número de células de las dos líneas celulares derivadas de astrocitomas humanos.

III. INTRODUCCIÓN

La progesterona (P4) es una hormona esteroide que participa en la regulación de diversos procesos fisiológicos de los mamíferos. Muchos de los efectos de la P4 están mediados por su receptor intracelular (RP), el cual es un factor de transcripción activado por ligando. Existen dos isoformas del RP (RP-A y RP-B) que están codificadas en un único gen, que en humanos se encuentra en el cromosoma 11. Diversos estudios han encontrado que la expresión de ambas isoformas se ve alterada en distintos tipos de tumores y uno de los mecanismos propuestos es la metilación del DNA. Este mecanismo es una modificación enzimática de las citosinas del DNA que se encuentran en una secuencia CpG y una alta frecuencia de estos dinucleótidos forman lo que se conoce como islas CpG. Existen muchos genes que tienen en sus regiones promotoras islas CpG y el RP es uno de ellos. El silenciamiento por metilación del gen del RP se ha reportado en distintos tumores donde su expresión es inducida por un agente hipometilante. Sin embargo, se desconoce si la expresión del RP en astrocitomas humanos está regulada por metilación, por lo que en este trabajo se determinó el efecto del agente hipometilante 5Aza sobre la expresión del mismo.

IV. ANTECEDENTES

4.1. Características generales de los astrocitomas

La incidencia anual de tumores cerebrales primarios a nivel mundial es de aproximadamente siete por cada 100 mil individuos (Furnari *et al.*, 2007; Xie, 2009), de los cuales los gliomas representan el 70% (Schwartzbaum *et al.*, 2006). Los gliomas son tumores neuroectodérmicos que tienen características de células gliales, pero de los cuales se desconoce su origen. En un principio, se creía que surgían a partir de células gliales bien diferenciadas, pero hoy en día se piensa que existe una ventana de vulnerabilidad neoplásica en la cual ocurren eventos oncogénicos en células fetales en proliferación. En esta teoría, los tumores neuronales son poco comunes, ya que sólo pueden ocurrir eventos oncogénicos durante el desarrollo embrionario temprano. En cambio, los tumores gliales son más comunes y surgen a una edad más avanzada, debido a que la proliferación glial ocurre en un periodo más largo durante la gestación y la vida postnatal (Louis, 2006). Recientemente se ha sugerido que los tumores gliales surgen de células troncales neuroectodérmicas. Estas células se encuentran en el adulto y tienen un alto potencial de proliferar, migrar y diferenciarse, por lo que son candidatos potenciales como progenitores de tumores gliales (Louis, 2006; Alcantara Llaguno *et al.*, 2009b).

Los gliomas se catalogan de acuerdo a sus características histológicas e inmunohistoquímicas en: astrocitomas, oligodendrogliomas y oligoastrocitomas (Furnari *et al.*, 2007), de los cuales los astrocitomas son los más frecuentes (Kim *et al.*, 1991). Todos los gliomas son más frecuentes en hombres que en mujeres, aunque esta diferencia es bastante pequeña en el caso de los oligodendrogliomas. En cuanto a los astrocitomas esta proporción es de 3:2, la cual se observa principalmente en los astrocitomas de mayor grado de evolución (Schwartzbaum *et al.*, 2006).

Los astrocitomas han sido clasificados por la Organización Mundial de la Salud en cuatro grados (I-IV) de acuerdo a su nivel de malignidad, basado en las

características histológicas y las alteraciones genéticas que presentan. Los tumores grado I o astrocitomas pilocíticos son tumores que presentan atipia nuclear y pueden ser eliminados si se remueven quirúrgicamente. La sobrevida del paciente es de 11 a 15 años. Los astrocitomas difusos o de grado II son tumores de baja malignidad, pero debido a su infiltración temprana hacia el parénquima es imposible que sean operados. Son tumores que presentan células multinucleadas, un lento crecimiento celular y los bordes son poco definidos. La sobrevida de los pacientes es de entre 5 y 10 años. Los astrocitomas grado III o anaplásicos muestran una mayor dediferenciación, células multinucleadas y una mayor proliferación que los de grado II, por lo que se pueden volver mortales más rápidamente. Generalmente el paciente muere en menos de tres años. Las terapias tanto para los astrocitomas de grado II como de grado III son la quimio y/o la radioterapia. Por último, los tumores de grado IV, también llamados glioblastomas, presentan una proliferación celular descontrolada, mayor infiltración, propensión a la necrosis, angiogénesis robusta, resistencia a la apoptosis e inestabilidad genómica. Son tumores más resistentes a la quimio y/o radioterapia y son letales en un lapso de 12 meses, por lo que se les considera el tipo de glioma más agresivo. Además, son los más frecuentes representando un 69% de todos los casos de astrocitomas (Ohgaki y Kleihues, 2005; Louis, 2006; Furnari *et al.*, 2007; Alcantara Llaguno *et al.*, 2009a). Los glioblastomas se han subdividido de acuerdo a las alteraciones genéticas que presentan en aquellos que surgen *de novo* y los que derivan de una progresión paulatina de tumores de menor grado, ya que el 70% de los astrocitomas de grado II se transforman en grado III y IV. Aunque no existen diferencias histológicas entre ellos, los que surgen *de novo* son los más frecuentes y se presentan en pacientes mayores a 55 años mientras que los progresivos son menos frecuentes y tienden a ocurrir en pacientes menores de 45 años (Godard *et al.*, 2003; Furnari *et al.*, 2007).

En los astrocitomas humanos se han descrito una variedad de mutaciones que afectan normalmente a aquellos genes que participan en la regulación del ciclo celular y de la apoptosis, como el gen de la cinasa dependiente de ciclina 4 (CDK4) y del inhibidor de la cinasa dependiente de ciclina (INK4A) así como el gen de retinoblastoma (RB) y de la proteína tumoral 53 (TP53). También se encuentran

mutados genes que participan en las cascadas de señalización de receptores a factores de crecimiento como el receptor al factor de crecimiento epidérmico (EGFR), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y el homólogo de fosfatasa y tensina (PTEN) (Furnari *et al.*, 2007). En la mayoría de los astrocitomas de grado IV se han identificado anomalías cromosómicas como son la presencia de una o más copias del cromosoma 7, pérdida del cromosoma 10 y deleciones y translocaciones en el cromosoma 9. También se han detectado en menor grado pérdidas del cromosoma 22 y deleciones en los cromosomas 1 y 7 (Bigner *et al.*, 1990).

El tratamiento dado a los pacientes que presentan astrocitomas depende tanto del grado de evolución del tumor como de su tamaño, localización, tasa de crecimiento y síntomas. Las terapias para tratar este tipo de tumores incluyen desde su extirpación por cirugía hasta la radiación y la quimioterapia. A pesar de los avances en estas terapias, no siempre se aumenta la tasa de supervivencia de los pacientes y además se comprometen muchas de las funciones cerebrales (Camacho-Arroyo, 2003; de la Fuente *et al.*, 2007), por lo que los astrocitomas siguen siendo de los tumores más letales. La resistencia a las diferentes terapias se debe principalmente a su frecuente recurrencia. Para explicar su reincidencia se han planteado dos modelos: la hipótesis de la evolución clonal (Nowell, 1976) y la hipótesis de las células troncales cancerosas (Dick, 2008). La primera sugiere que debido a la inestabilidad de los tumores, surgen subpoblaciones de células con diferentes mutaciones que son seleccionadas por el microambiente generado por el propio tumor durante la progresión del cáncer y/o por los tratamientos. La segunda hipótesis propone que en los tumores hay células troncales capaces de propagarse, de sostener el crecimiento prolongado del tumor o de iniciar la formación de uno nuevo. Estas células son relativamente quiescentes, tienen una mayor resistencia al daño al DNA y son muy eficientes exportando moléculas dañinas como las drogas, por lo que son difíciles de eliminar con terapias convencionales que atacan células altamente proliferativas. La hipótesis de las células troncales cancerosas ha llamado la atención dado que puede llevar a buscar nuevas estrategias terapéuticas (Dietrich *et al.*, 2008; Xie, 2009). Para ello se requiere del estudio de los

mecanismos moleculares y celulares que subyacen a la formación de dichos tumores. Una terapia alternativa podría ser aquella basada en hormonas esteroides tales como la progesterona (P4), por lo que es importante conocer sus mecanismos de acción (Camacho-Arroyo, 2003).

4.2. Efectos y mecanismos de acción de la progesterona

La P4 es una hormona esteroide derivada del colesterol que se sintetiza principalmente en el ovario, en la glándula adrenal y en la placenta. Esta hormona participa en la regulación de la ovulación, la implantación del óvulo, la diferenciación y el comportamiento sexual, el embarazo y la protección al daño neuronal, entre otros. La hormona actúa en diferentes tejidos como son el cerebro, el útero, el páncreas, el pulmón, el ovario, la glándula mamaria, el hueso, etc. y muchos de los efectos que tiene están regulados por receptores intracelulares (RP) (Graham and Clarke, 1997; Camacho-Arroyo y Rodríguez-Dorantes, 2006; Scarpin *et al.*, 2009).

La P4 también tiene efectos diferentes sobre una misma célula activando mecanismos que involucran a varias proteínas en compartimentos intracelulares distintos (Camacho-Arroyo, 2003). Basado en esto, sus efectos se pueden clasificar como genómicos y no genómicos. El primer mecanismo comprende todos los efectos a largo plazo, los cuales están modulados por el RP que regula la expresión de genes blanco (Conneely *et al.*, 2003). En cambio, el segundo mecanismo ocurre principalmente a nivel de la membrana y del citoplasma, induciendo los efectos a corto plazo (Gellersen *et al.*, 2009). No obstante, existe la posibilidad de que ambos mecanismos se entrecrucen permitiendo a la hormona tener una regulación mucho más fina sobre varias funciones celulares (Camacho-Arroyo y Rodríguez-Dorantes, 2006).

En el mecanismo no genómico, la hormona o sus metabolitos pueden activar diversas cascadas de señalización. La P4 interactúa con el RP extranuclear para activar a cinasas con dominios SH3 como la cinasa Src (Boonyaratankornkit *et al.*, 2001). También se ha observado que la hormona interactúa con receptores

localizados en la membrana plasmática (mRP), lo cuales tienen una estructura y un perfil farmacológico diferente al RP. Sin embargo, todavía han sido poco estudiados (Thomas, 2008). La P4 es capaz de activar a canales iónicos de Ca^{2+} y K^{+} , puede interactuar con sitios alostéricos localizados en los receptores a neurotransmisores tales como los receptores a GABA (Henderson, 2007; Lishko *et al.*, 2011), y con receptores acoplados a proteínas G activados por factores de crecimiento y neurotransmisores. Estas interacciones producen cambios en la conductancia iónica, la activación de cascadas de segundos mensajeros, la producción de AMP cíclico y la activación de cinasas como la proteína cinasa C (PKC) y las cinasas activadas por mitógenos (MAPK) (Boonyaratankornkit *et al.*, 2007; Gellersen *et al.*, 2009).

Por otro lado, el mecanismo genómico implica la regulación de la transcripción de los genes blanco mediada por el RP. Este mecanismo ocurre en varios pasos donde primero la P4 entra por difusión simple a la célula e interactúa con su receptor. El receptor se mantiene inactivo gracias a que se encuentra unido a un complejo proteínico conformado por las proteínas de choque térmico Hsp70/Hsp90 y Hsp40, la proteína p23 y otras co-chaperonas como las proteínas FKBP 51 y 52. La asociación con chaperonas le confiere una conformación determinada que le permite unir a la hormona con gran afinidad (Schülke *et al.*, 2010). Una vez unido a su ligando, el receptor se disocia de dichas proteínas, se dimeriza con otra molécula de RP y es fosforilado por MAPK en varios residuos de serina como Ser294 y Ser345 (Conneely *et al.*, 2003; Daniel *et al.*, 2009; Ward y Weigel, 2009). El complejo RP:RP interactúa con los elementos de respuesta a P4 (ERP), los cuales están formados por una secuencia repetida imperfecta e invertida que se localiza en la región promotora de los genes blanco. Al mismo tiempo se reclutan varios coreguladores como son los de la familia p160 como es el coactivador SRC-1 y otros factores generales de la transcripción para formar un complejo de iniciación e inducir la expresión de los genes blanco (Figura 1). El RP también puede activar la transcripción de manera indirecta al unirse a otros factores de transcripción como las proteínas Sp1, AP-1 y STATs (Camacho-Arroyo, 2003; Conneely *et al.*, 2003; Camacho-Arroyo y Rodríguez-Dorantes, 2006; Hagan *et al.*,

2009). Tras la transcripción, el RP es degradado de manera dependiente de ligando a través de la vía ubiquitina-proteosoma así como los coactivadores que se encuentran unidos al receptor (Lange *et al.*, 2000, Villamar-Cruz *et al.*, 2006).

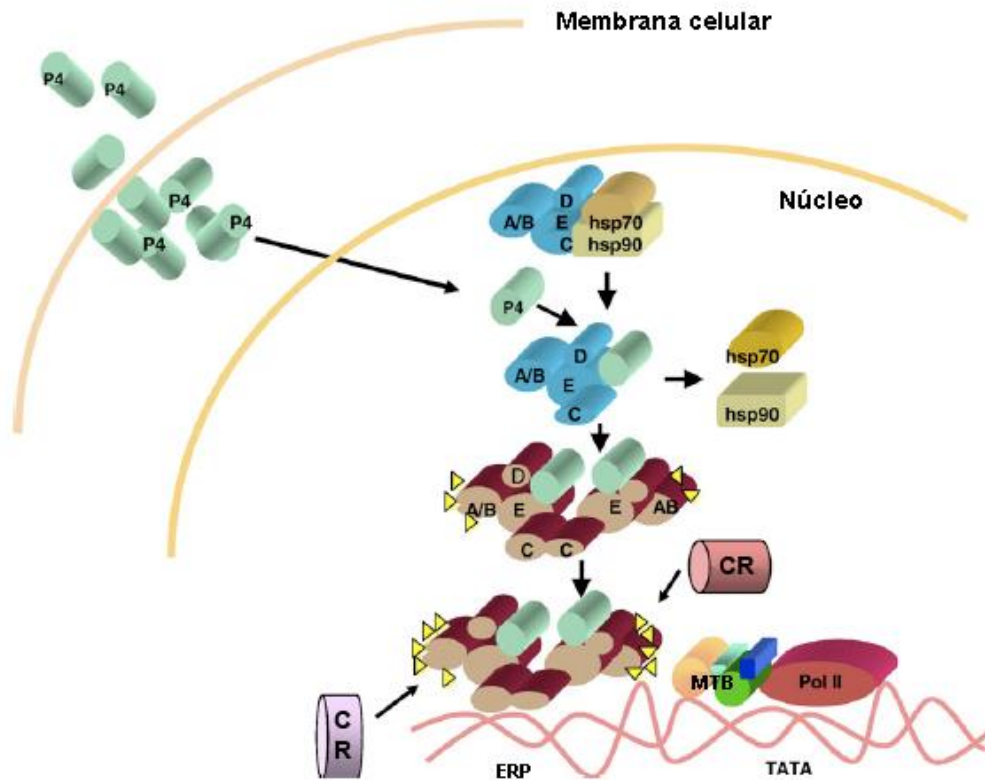


Figura 1: Mecanismo genómico de la P4. La P4 entra a la célula por difusión simple e interactúa con su receptor intracelular que se encuentra unido a proteínas chaperonas como Hsp70/90. El receptor está formado por cinco dominios (A-E) y al unirse a su ligando y activarse se dimeriza, es fosforilado (triángulos) y se une a los elementos de respuesta a P4 (ERP). Esto permite que se reclute la maquinaria de transcripción basal (MTB) junto con la DNA polimerasa II para así regular la expresión de los genes blanco. El dímero de RP puede asociarse a coreguladores (CR) que también modulan la expresión génica (Tomada y modificada de Camacho-Arroyo, 2003).

4.3. Estructura y función del receptor a progesterona

El RP es una proteína clasificada dentro de la superfamilia de receptores nucleares que se catalogan en tres diferentes clases. La primera incluye los

receptores a hormonas esteroides, entre los que se encuentran los receptores a estrógenos α y β ($RE_{\alpha/\beta}$), el RP-A y RP-B, el receptor a glucocorticoides (RG), el receptor a mineralocorticoides (RM) y el receptor a andrógenos (RA). La segunda clase está representada por los receptores X de retinoides ($RXR_{\alpha/\beta/\gamma}$), el receptor a la vitamina D (RVD), el receptor de activación de la proliferación de peroxisomas ($RAPP_{\alpha/\gamma/\delta}$) y el receptor a hormonas tiroideas ($RT_{\alpha/\beta}$). La tercera clase comprende a todos los receptores huérfanos, de los cuales se desconoce su ligando. Todos ellos son factores de transcripción que se activan al unirse a su ligando y se cree que surgieron de un ancestro común (Edwards, 2000; Ellmann *et al.*, 2009).

La cadena polipeptídica de los receptores a hormonas esteroides está dividida estructural y funcionalmente en varios dominios. El dominio A/B del extremo amino terminal es el más variable en su secuencia y en su longitud. Este dominio tiene funciones de activación (AF) que regulan la transcripción de genes blanco (Nussey y Whitehead, 2001; Ellmann *et al.*, 2009). El dominio C posee la región más conservada que es el dominio de unión al DNA (DBD). El DBD contiene dos dedos de zinc, cada uno con cuatro residuos de cisteína conservados, que participan en la dimerización del receptor y en el reconocimiento del DNA. En particular, el RP reconoce la secuencia consenso TGTACAnnnTGTTCT. Este reconocimiento está determinado por dos α -hélices que forman parte del DBD, una se encuentra entre los dos dedos de zinc y la otra se extiende a partir del carboxilo terminal del segundo dedo de zinc hasta ubicarse por arriba de la primera hélice en una posición perpendicular. La primera hélice es la que interactúa directamente con las bases del surco mayor del DNA reconociendo la secuencia consenso y la segunda le confiere estabilidad al complejo y participa en la dimerización del receptor (Edwards, 2000; Nussey y Whitehead, 2001; Ellman *et al.*, 2009).

Por otro lado, el dominio D es una región en forma de horquilla que contiene la secuencia de localización nuclear y los sitios de unión para las proteínas chaperonas que mantienen los receptores en un estado inactivo. El dominio E es multifuncional pues contiene el sitio de unión al ligando, una función de activación (AF-2) dependiente de ligando, una segunda secuencia de localización nuclear y

varios sitios de unión a chaperonas y coreguladores (Edwards, 2000; Nussey y Whitehead, 2001; Camacho-Arroyo y Rodríguez-Dorantes, 2006; Ellmann *et al.*, 2009) (Figura 2).

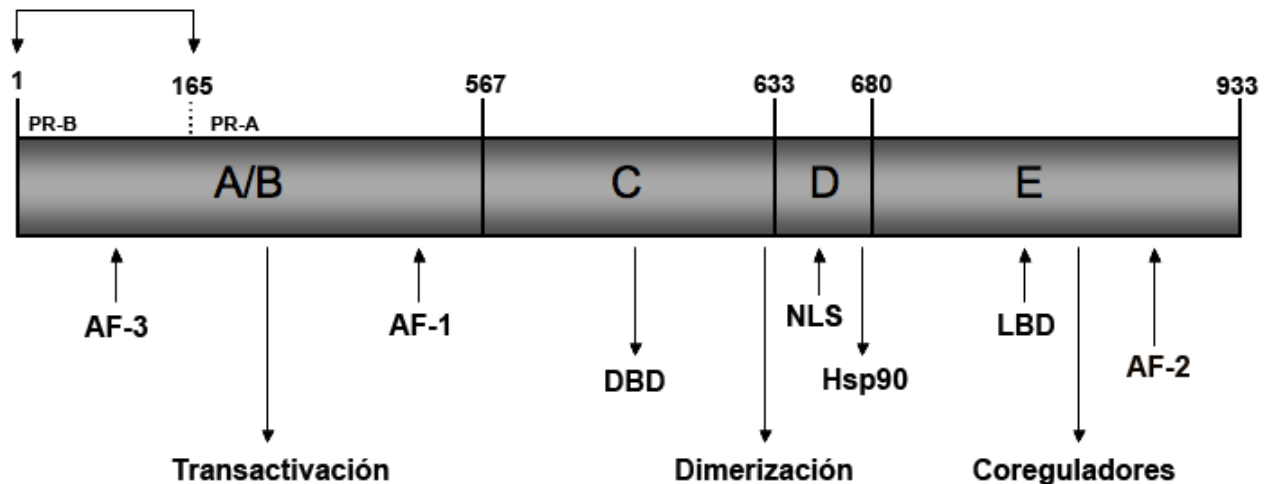


Figura 2: Representación esquemática de los dominios del RP. El receptor consta de cinco dominios denominados de la A a la E. El dominio A/B se encuentra en el extremo amino terminal y tiene dos funciones de activación (AF-3 y 1) que participan en la regulación de la transcripción de los genes blanco. El dominio C contiene el dominio de dimerización y el dominio de unión al DNA (DBD) que se caracteriza por tener dos dedos de zinc. El dominio D tiene las secuencias de localización nuclear (NLS) y la de unión a chaperonas (Hsp90). El dominio E tiene la región de unión al ligando (LBD), la de unión a coreguladores y hacia el extremo carboxilo terminal tiene una función de activación (AF-2). En el esquema también se muestra el número de aminoácidos que tiene cada dominio y las isoformas RP-A y RP-B (Tomada y modificada de Camacho-Arroyo y Rodríguez-Dorantes, 2006).

Uno de los factores críticos involucrados en las respuestas biológicas a la P4 es la presencia de dos isoformas del receptor. Estas dos especies moleculares regulan la expresión de diferentes genes y por tanto también distintas funciones dentro de la célula. Existen dos principales isoformas, RP-A y RP-B, las cuales han sido descritas en aves, reptiles y mamíferos, incluido el ser humano (González-Agüero *et al.*, 2001; Camacho-Arroyo *et al.*, 2003; Guerra-Araiza *et al.*, 2009; O'Connell *et al.*, 2011). En el humano, la isoforma RP-A pesa 94 kDa y RP-B 116 kDa. En líneas celulares de cáncer de mama humano y en el útero de ratas preñadas se ha encontrado una tercera isoforma, RP-C, de entre 50 y 78 kDa que carece de la región amino terminal y parte del dominio DBD. Aunque su función se

desconoce, aparentemente no tiene un papel fisiológico en la vía de señalización de la P4 (Graham y Clarke, 2002; Conneely *et al.*, 2003; Camacho-Arroyo y Rodríguez-Dorantes, 2006; Cork *et al.*, 2008; Scarpin *et al.*, 2009).

La diferencia entre las isoformas RP-A y RP-B es que la segunda tiene de 128-164 aminoácidos más en el extremo amino terminal que la isoforma RP-A, longitud que varía de acuerdo a la especie. En el humano y en los roedores las isoformas se generan a partir de dos mRNA diferentes, mientras que en las aves resultan de un splicing alternativo (Graham y Clarke, 2002; Conneely *et al.*, 2003; Camacho-Arroyo *et al.*, 2007).

A pesar de tener una afinidad similar a su ligando, las isoformas del RP tienen diferentes funciones de acuerdo con su estructura, el contexto celular y sus genes blancos. Tanto RP-A como el RP-B coexisten en la misma célula, aunque en ausencia de ligando RP-A se encuentra principalmente localizada en el núcleo y RP-B está distribuida entre el núcleo y el citoplasma (Boonyaratanakornkit *et al.*, 2008). La presencia de secuencias de importación y exportación nuclear asegura que haya un intercambio continuo entre el citoplasma y el núcleo. Este equilibrio dinámico favorece la compartimentalización nuclear del receptor, en especial de RP-A, cuando interactúa con su ligando (Gellersen *et al.*, 2009).

El RP puede unirse al DNA en tres diferentes dímeros: A::A; A::B o B::B, todos con propiedades diferentes de activación (Conneely *et al.*, 2003; Mani, 2008). Ambas isoformas tienen la misma afinidad por el DNA, pero su capacidad de transactivación es diferente. Se ha observado que la isoforma RP-B es un mejor activador transcripcional que RP-A, lo cual se asocia a la presencia de la función de activación AF-3 en su región N-terminal. Esta función requiere de la unión del DNA para estar completamente activa y actúa sinérgicamente con las funciones AF-1 y AF-2, aunque esto último depende del tipo de promotor y de la cantidad de ERP presentes (Sartorius *et al.*, 1994; Tung *et al.*, 2006).

Contrario a RP-B, la isoforma RP-A tiene una función de inhibición (IF) que no está activa en la isoforma RP-B (Hovland *et al.*, 1998). La delección de la IF incrementa la actividad transcripcional de RP-A, aunque esta autoinhibición requiere de la presencia del dominio LBD. La isoforma RP-A no sólo es capaz de

autoinhibirse, sino que también puede reprimir la actividad transcripcional de RP-B, RE y RG. A esta capacidad se le conoce como transrepresión y al parecer depende de la unión de la proteína SUMO-1 a la región IF (Abdel-Hafiz *et al.*, 2002). Esta propiedad le permite al RP-A regular los efectos que tienen distintas hormonas en las células (Graham y Clarke, 1997 y 2002; Conneely *et al.*, 2003; Ellmann *et al.*, 2009)

Las diferencias en la actividad transcripcional de las isoformas también dependen del tipo de coreguladores que recluten y de la abundancia de los mismos (Giangrande *et al.*, 2000). En presencia de ligando el RP une preferentemente coactivadores como los de la familia p160 y en ausencia de ligando o en presencia de antagonistas une principalmente correpresores como NCoR y SMRT (Scarpin *et al.*, 2009). Las isoformas toman una conformación diferente en la célula, lo que les permite unir distintos tipos de coreguladores (Bain *et al.*, 2001; Tung *et al.*, 2006). La isoforma RP-B tiene una mayor capacidad de unir coactivadores en presencia de ligando que RP-A, mientras que esta última une correpresores con mayor afinidad en presencia de antagonistas (Giangrande *et al.*, 2000; Tung *et al.*, 2006; Molenda-Figueira *et al.*, 2008; Scarpin *et al.*, 2009). Los coreguladores modulan la función de transactivación del RP principalmente por que los coactivadores como SRC-1 y SRC-3 tienen actividad de acetiltransferasa de histonas (HAT), mientras que los correpresores están asociados a desacetilasas de histonas (HDAC). Esto permite que el DNA sea más o menos accesible para el RP (Edwards, 2000; Giangrande *et al.*, 2000; McKenna y O'Malley, 2002).

Por otro lado, las isoformas del RP sufren diferentes modificaciones postraduccionales como fosforilación, ubiquitinación, sumoilación y acetilación. El RP tiene catorce sitios de fosforilación, de los cuales la mayoría se encuentran en la isoforma RP-B, lo que le confiere una actividad diferente (Knotts *et al.*, 2001). La fosforilación puede ocurrir de manera basal, en presencia de ligando o tras la activación de MAPK o CDK2. También se sabe que la sumoilación puede reprimir la actividad transcripcional y que la ubiquitinación promueve la degradación del receptor (Camacho-Arroyo *et al.*, 2002; Daniel *et al.*, 2009; Ward y Weigel, 2009).

La estructura diferencial de las isoformas del RP, la dimerización, las modificaciones postraduccionales y el reclutamiento de distintos coactivadores confiere respuestas tejido específicas y una regulación diferencial de los genes blanco (Mani, 2008). En estudios de perfiles de expresión han encontrado que las isoformas RP-A y RP-B regulan conjuntos de genes diferentes y sólo un pequeño grupo de genes son regulados por ambas isoformas (Richer *et al.*, 2002; Tung *et al.*, 2006; Tamm *et al.*, 2009). Por lo tanto, las respuestas a la P4 varían de un tejido a otro y dependen en gran medida de la relación RP-A:RP-B. Los cambios en la proporción de las isoformas se han relacionado con enfermedades como el cáncer (Graham y Clarke, 2002).

La expresión de las isoformas del RP está regulada principalmente por P4 y por estradiol (E2), ambos a un nivel tanto transcripcional como traduccional. A pesar de que las isoformas están reguladas de manera diferencial por estas hormonas en diferentes células y condiciones hormonales, en muchos tejidos el E2 modula su expresión a la alta y la P4 a la baja (Kraus y Katzenellenbogen, 1993; Guerra-Araiza *et al.*, 2003; Flötotto *et al.*, 2004). La regulación positiva por E2 a través de su ER se debe la presencia de elementos de respuesta a estrógenos (ERE) en las regiones reguladoras del gen del RP (Savouret *et al.*, 1991), mientras que la regulación negativa ejercida por P4 se ha asociado a la degradación dependiente de ligando que se lleva a cabo por la vía del proteosoma (Turgeon y Waring, 2000; Camacho-Arroyo *et al.*, 2002).

4.4. Regulación de la expresión del gen del receptor a progesterona

Las isoformas RP-A y RP-B están codificadas por un sólo gen que en los humanos se encuentra como una única copia localizada en el cromosoma 11q22-23 y está compuesto de ocho exones de diferentes tamaños y siete intrones. El gen tiene dos promotores y dos sitios de inicio de la traducción los que producen las dos isoformas del receptor. El promotor de la isoforma A, localizado de +464 a +1105 tiene tres sitios de inicio de la transcripción (+751, +761 y +842) y un sitio de inicio

de la traducción ATG1 en +1236. El promotor de la isoforma B (-711 a +31) tiene dos sitios de inicio de la transcripción en +1 y +15 y un sitio de inicio de la traducción ATG2 en +744 (Figura 3). Una característica de ambos promotores es que carecen de un típica caja TATA (Kastner *et al.*, 1990).

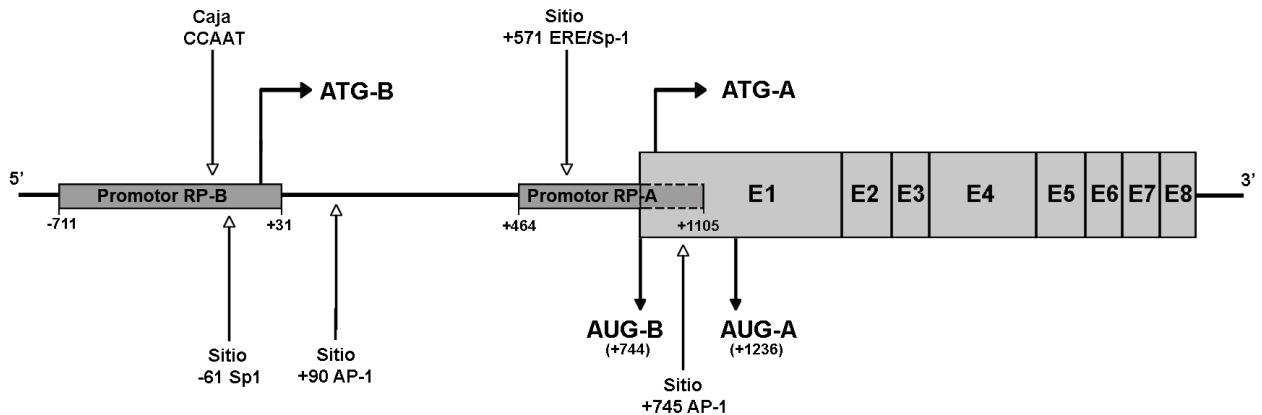


Figura 3: Estructura del gen del RP. El gen está compuesto por ocho exones (E1-E8) y tiene dos promotores que inducen la expresión de las dos isoformas del receptor, RP-A y RP-B. Las flechas en horizontal representan los sitios de inicio de la transcripción, tres para la isoforma A (ATG-A) y dos para la isoforma B (ATG-B). El esquema también muestra los sitios de inicio de la traducción (AUG-A y AUG-B). Asimismo está representada la localización de los diferentes sitios de unión a las proteínas Sp1 y AP-1 al igual que los sitios de unión al ER y la caja CCAAT.

El RP se ha caracterizado como un gen inducido por estrógenos. Los modelos clásicos de la acción de estrógenos han propuesto que el RE induce la expresión de genes blanco al unirse a su ligando y después a los ERE localizados en el DNA. A pesar de esto, ninguno de los promotores del RP tiene un típico ERE palindrómico (Ellmann *et al.*, 2009; Kastner *et al.*, 1990). Sin embargo, la respuesta a estrógenos también puede estar mediada a través de la interacción del RE con factores de transcripción unidos al DNA tales como las proteínas AP-1 y Sp1 (Ellmann *et al.*, 2009).

En el promotor de la isoforma RP-A existe una región que va de +571 hasta +595 que contiene un medio sitio ERE (TGACC) seguido de dos sitios de unión a Sp1, uno distal y otro proximal. A esta región se le conoce como el sitio +571 ERE/Sp1. El ERE y el sitio Sp1 distal están muy conservados en humano, rata y

ratón, mientras que el sitio Sp1 proximal tiene una secuencia muy similar a la secuencia consenso de unión a Sp1 (Petz *et al.*, 2004a). Se sabe que el ER α es capaz de interactuar con la proteína Sp1 a través de su dominio de unión al DNA (DBD) y de su dominio de unión al ligando (LBD) promoviendo así la unión de Sp1 al DNA. Tanto el sitio Sp1 proximal como el distal son importantes para inducir la respuesta a estrógenos (Petz y Nardulli, 2000; Petz *et al.*, 2004a). No obstante, a diferencia del RE α , que se asocia al DNA en presencia de estrógenos, las proteínas Sp1 se pueden unir al DNA en ausencia o en presencia de la hormona.

Petz y colaboradores (2004a) estudiaron el sitio +571 ERE/Sp1 y encontraron que las mutaciones en el ERE que inhiben la asociación del RE α al DNA pero que mantienen la unión de Sp1, aumentan la transcripción del gen del RP. Por lo tanto, ellos sugieren que los sitios Sp1 por sí mismos pueden inducir la respuesta a estrógenos, mientras que la unión del RE α a su sitio ERE puede estar limitando la transcripción del RP. Al parecer la unión de Sp1 al sitio +571 ERE/Sp1 mantiene la transcripción basal del RP en ausencia de estrógenos (Petz *et al.*, 2004a).

En cuanto al promotor de la isoforma RP-B, éste tiene una caja CCAAT (-70 a -66) y dos sitios adyacentes de unión a proteínas Sp1 (-61 a -53 y -49 a 41) (Kastner *et al.*, 1990; Schultz *et al.*, 2003). La proteína Sp1 se une más eficientemente a su sitio de unión más proximal, el cual es un potente inductor de la transcripción, que al distal. En estos sitios, el RE α fomenta la unión de Sp1, pero no se une directamente al DNA. La interacción de RE α con el complejo Sp1-DNA contribuye a la expresión del gen del RP inducida por E2 (Schultz *et al.*, 2003).

Además de estos sitios, existe un sitio de unión a AP-1 (TGAGTGA) de +90 a +96 que se encuentra en la región entre los promotores A y B. El sitio difiere de una secuencia consenso de unión a AP-1 (TGA^G/C^CTCA) por una única base. Este sitio AP-1 se encuentra junto a un medio sitio ERE (GGTCA). Las proteínas AP-1, Fos y Jun, se unen en forma de heterodímero al sitio +90 AP-1, interacción inducida por la asociación del RE a su ERE. La asociación de las tres proteínas depende de la presencia de E2 y su interacción cooperativa contribuye a la regulación de la expresión del gen del RP (Petz *et al.*, 2002).

Existe otro sitio AP-1 (+745 a +751) que se encuentra conservado en humano, conejo, rata y ratón que también es capaz de unir heterodímeros de Fos/Jun. A diferencia del sitio +90 AP-1, la proteína Jun se encuentra siempre unida al sitio +745 AP-1, pero se asocia a RE α y a Fos únicamente en presencia de estrógenos. Además, las mutaciones en el sitio +745 AP-1 potencian la transactivación del RP a través del RE α , sugiriendo que el sitio AP-1 silvestre participa en la inhibición de la expresión del gen del RP en presencia de E2 (Petz *et al.*, 2004b).

La respuesta mediada por estrógenos del gen del RP puede por tanto ocurrir sólo en presencia de sitios AP-1 o Sp1. Al parecer los sitios Sp1 son mejores inductores de la transcripción que los sitios AP-1, pero en conjunto potencian la respuesta a estrógenos. El sitio -61 Sp1 activa la transcripción en mayor medida que el resto de los sitios Sp1, lo que sugiere que éstos tienen diferentes capacidades de activar la transcripción y no son completamente equivalentes (Schultz *et al.*, 2005).

Por otro lado, existen varios elementos *cis* que se localizan lejos del promotor más proximal y que juegan un papel importante en la regulación de la expresión del gen. Con base en estudios genómicos se han encontrado regiones reguladoras que se asocian a RE α ubicadas hacia la región 5' entre 48-311 kb del sitio de inicio de la transcripción de la isoforma RP-B. Estos ERE son capaces de conferir una respuesta a estrógenos, aunque varía su capacidad de inducir la transcripción. Algunos de estos sitios interactúan con la región proximal del gen del RP en ausencia de E2, por lo que al parecer dichas regiones están involucradas en mantener los niveles basales de expresión del RP (Bonéy-Montoya *et al.*, 2010).

En el gen del RP, no sólo existen regiones reguladoras en el extremo 5', sino también hay algunas que se localizan en la región 3' no traducida (3'UTR). En cáncer de mama, la expresión de ciclina D1 está asociada a los niveles observados de RE y RP. Ciclina D1 es capaz de interactuar con coactivadores del RE para activar ERE de manera dependiente de ligando. Estudios recientes han demostrado que el RP es regulado por ciclina D1 y el RE a través de un "enhancer" que se

encuentra en la región 3'UTR del gen del RP. Este enhancer tiene un ERE clásico que está muy conservado y responde a ciclina D1 (Yang *et al.*, 2010).

Además de la regulación de la expresión del gen del RP por factores de transcripción, existen también mecanismos epigenéticos que la modulan. La regulación epigenética involucra todos aquellos mecanismos que modifican la expresión génica sin alterar la secuencia del DNA (Portela y Esteller, 2010). Entre ellos se encuentra la regulación por RNAs antisentido no codificantes (Faghidi y Wahlestedt, 2009). El gen del RP es regulado por RNAs antisentido que se sobrelapan con la región promotora y que se transcriben desde el promotor de RP-A hasta unas 70 kb en dirección 5'. Estos RNAs antisentido son blanco de otros RNA pequeños de doble cadena que junto con la proteína argonauta 2 regulan la expresión del RP (Schwartz *et al.*, 2008; Chu *et al.*, 2010; Watts *et al.*, 2010).

El RP también es regulado por micro RNAs (miRNAs), pequeños RNA endógenos no codificantes de 18 a 22 nucleótidos que regulan la expresión de genes a nivel postranscripcional. Estos miRNAs se unen a un mRNA blanco por apareamiento de bases e inducen su degradación. El miRNA miR-126-3p inhibe la expresión del RP al unirse a su región 3'UTR en células epiteliales de tejido mamario de ratón. Al parecer esta inhibición reduce también la proliferación de las células (Cui *et al.*, 2011).

Otro mecanismo de regulación epigenético es la modificación postraduccional de las histonas como la acetilación, metilación o fosforilación. Se sabe que el aumento en los niveles de acetilación de las histonas está relacionado con la activación transcripcional, mientras que los niveles bajos de acetilación están asociados a un silenciamiento de la transcripción (Mompalmer y Bovenzi, 2000). Algunos sitios ERE localizados en regiones distales están unidos a proteínas relacionadas con la acetilación de las histonas por lo que la acetilación en estas regiones es importante para la regulación de la transcripción del gen del RP (Bonéy-Montoya *et al.*, 2010). De hecho, en un estudio de la línea celular de cáncer de mama C4 que no expresa el RP se encontró una pérdida local de la acetilación de las histonas, lo cual podría estar afectando la unión de factores de transcripción o la capacidad de formar un complejo activo de transcripción (Xu *et al.*, 2004). Por

otro lado, la desmetilasa JARID1A modula la expresión del gen del RP mediada por E2 en la línea celular de cáncer de mama MCF-7. Esta enzima se une a una secuencia localizada en el sitio +571 ERE/Sp1 y desmetila a la lisina 4 de la histona H3 (H3K4). La desmetilación provoca una inhibición de la transcripción del RP. Se cree que JARID1A regula la metilación local de la H3K4 y su interacción con el RE α modula la expresión del RP (Stratmann y Haendler, 2011)

Al igual que la acetilación o metilación de las histonas, la metilación del DNA regula la transcripción de los genes al modular la conformación de la cromatina y la unión de factores de transcripción y el RP, como muchos genes, es susceptible a la metilación.

4.5. La metilación del DNA

La metilación del DNA en los vertebrados es una modificación enzimática covalente que genera una información epigenética heredable que no está codificada en la secuencia de nucleótidos. En las células de los mamíferos, aproximadamente el 1% de los residuos de citosina del DNA genómico tienen un grupo metilo unido al carbono cinco (C₅) del anillo pirimidínico (Momparler y Bovenzi, 2000; Rodríguez-Dorantes *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2009). Esta modificación es importante durante el desarrollo de un organismo, pues participa en la impronta genómica, en la inactivación del cromosoma X, en la senescencia y el envejecimiento, en la represión de transposones, como mecanismo de inactivación de genes de origen viral, etc. Las alteraciones en su regulación tienen diversas consecuencias incluyendo la expresión errónea de los genes y la apoptosis, por lo que pueden participar en el desarrollo de ciertas enfermedades como el cáncer (Momparler y Bovenzi, 2000; Rodríguez-Dorantes *et al.*, 2004).

La metilación en los residuos de citosina es un proceso catalizado por las enzimas metiltransferasas de DNA (DNMT), las cuales utilizan la S-adenosil metionina como donador del grupo metilo. En mamíferos se han encontrado cinco diferentes DNMTs: DNMT1, DNMT2, DNMT3a, DNMT3b y DNMT3L, pero

únicamente la DNMT1, 3a y 3b tienen actividad de metiltransferasa del DNA. Al parecer DNMT2 es una metiltransferasa de tRNA y la DNMT3L sirve como factor que estimula la actividad de las DNMT3a y 3b (Portela y Esteller, 2010; Scheafer y Lyko, 2010). La conservación del patrón de metilación del DNA durante la división celular es catalizada por la DNMT1, la cual tiene una preferencia por el DNA hemimetilado, por lo que se le conoce como la DNMT de mantenimiento. A las DNMT3a y 3b se las conoce como metiltransferasas *de novo*, dado que pueden añadir grupos metilos al DNA hemimetilado y desmetilado por lo que son importantes para establecer patrones de metilación durante el desarrollo embrionario (Momparler y Bovenzi, 2000; Bolander, 2004; Kim *et al.*, 2009; Portela y Esteller, 2010).

La mayoría de las 5-metilcitosinas se encuentran localizadas en dinucleótidos CpG y se ha estimado que representan de un 70-80% de todos los dinucleótidos CpG del genoma (Rodríguez-Dorantes *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2009). Cuando se presentan regiones de aproximadamente 200 pb a 1 kb con más de un 50% de G+C y una proporción (observada/esperada) de dinucleótidos CpG de 0.6, se dice que hay una isla CpG. Estas islas se sobrelapan con regiones promotoras en un 50-60% de los genes (Momparler y Bovenzi, 2000; Kim *et al.*, 2009). Se ha visto que las islas CpG se hallan en todos los promotores de los genes constitutivos y en aproximadamente el 40% de aquellos que se expresan en un tejido específico (Illingworth y Bird, 2009).

De acuerdo a la distribución de los dinucleótidos CpG a lo largo del extremo 5' de los genes, éstos se pueden clasificar en dos grupos. En la primera clase se incluyen los genes con promotores que contienen una baja frecuencia de CpG, la cual equivale al promedio observado a nivel del genoma (1%). El segundo grupo abarca los genes en los que la región promotora tiene islas CpG, es decir que la frecuencia de CpG es aproximadamente diez veces más alta que el promedio en el genoma (>10%) (Antequera, 2003). A pesar de que la mayoría de los CpG están metilados en el genoma, los dinucleótidos CpG en las islas de las regiones promotoras no se encuentran metiladas (Antequera, 2003; Kim *et al.*, 2009), aunque existe alrededor de un 6% que está metilado de manera tejido específica durante el

desarrollo (Portela y Esteller, 2010). Otra característica de las islas CpG es su organización a nivel de la cromatina. En estas regiones se observa normalmente una cromatina abierta, puesto que se presentan marcas específicas en las histonas, como la trimetilación H3K4 o la acetilación de las histonas H3 y H4, que en conjunto mantienen una cromatina laxa favoreciendo la transcripción (Antequera, 2003).

La metilación del DNA no sólo ocurre en las islas CpG, sino también en lo que se le conoce como las costas de las islas. En estas zonas, localizadas a una distancia de 2 kb de la isla, la densidad de dinucleótidos CpG es muy baja. La metilación de los CpG de las costas de las islas se ha asociado a la represión de la transcripción (Portela y Esteller, 2010).

En general, la metilación del DNA está relacionada con un silenciamiento génico. La inhibición de la expresión puede ocurrir a través de varios mecanismos, como es la represión directa al impedir la unión de factores de transcripción. Otro mecanismo es el reclutamiento de proteínas de unión a CpG metilados (MBD) que reclutan a su vez complejos que modifican a las histonas y que remodelan la cromatina. La unión de estas proteínas también evita la asociación de factores de transcripción. En esta familia de proteínas se encuentran la MBDP1, 2, 3 y 4 y la MeCP1 y 2. MeCP1 se une de manera preferencial a regiones con 12 dinucleótidos CpG metilados y con ello es capaz de reprimir la transcripción. En cambio, MeCP2 es una proteína que requiere un único dinucleótido metilado para unirse al DNA. En conjunto, estos complejos reprimen la transcripción de genes con promotores metilados (Mompalmer y Bovenzi, 2000; Wilson *et al.*, 2008) como por ejemplo el RE α el cual, en cáncer de mama, se encuentra reprimido por la metilación en la región promotora y por la unión de la proteína MeCP2 (Wilson *et al.*, 2008; Wilson y Westberry, 2009).

En algunas circunstancias, la metilación del DNA no conlleva a la represión de la expresión sino que está asociada a una transcripción activa. Esto ocurre cuando se presenta una metilación en la región codificante del gen y al parecer es frecuente en genes que se expresan constitutivamente (Portela y Esteller, 2010).

En células cancerosas, la metilación de DNA se ve fuertemente afectada. De manera global se observa una hipometilación, especialmente de regiones normalmente metiladas, lo que genera la activación de elementos transposables y provoca inestabilidad genómica, translocaciones e incluso la expresión desregulada de genes que son oncogénicos (Gopalakrishnan *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2009). En células cancerosas se ha observado que el nivel de 5-metilcitosinas es de un 20-60% menor que en células normales. Al parecer, esta hipometilación está involucrada con el desarrollo del tumor, pero no se sabe si el contenido de citosinas metiladas tiene una relación directa con la neoplasia. En las células cancerosas también se presenta una hipermetilación de promotores que contienen islas CpG, por lo que puede provocar el silenciamiento de muchos genes supresores de tumores, especialmente en aquellos genes que están involucrados con la reparación del DNA, el ciclo celular y la apoptosis (Momparler y Bovenzi, 2000; Ehrlich, 2002, Portela y Esteller, 2010).

La metilación del DNA ha sido muy estudiada en diferentes tipos de cáncer con el fin conocer los genes que se encuentran hiper o hipometilados para poder ser empleados como marcadores de diagnóstico (Burgess *et al.*, 2008). En muchos tumores la expresión y regulación de las isoformas del RP se encuentra alterada, lo que depende en muchos casos del grado de evolución del tumor (Camacho-Arroyo, 2003; Brinton *et al.*, 2008). Uno de los mecanismos que pueden regular la expresión diferencial de las isoformas del RP es la metilación del DNA.

4.6. Regulación por metilación de la expresión del RP en cáncer

La expresión de las isoformas del RP está regulada de manera diferencial en muchos tejidos, sin embargo, se desconocen los mecanismos moleculares involucrados en dicha expresión (Camacho-Arroyo 2003). Uno de los elementos que regulan la expresión génica es la metilación del DNA. El gen del RP tiene islas CpG en la región del promotor de la isoforma RP-A y del primer exón, mientras que el promotor de RP-B carece de ellas (Figura 4). Se ha observado que la inactivación

del RP en distintos tipos de cáncer en humanos está asociada con la metilación aberrante de las islas CpG de su región reguladora.

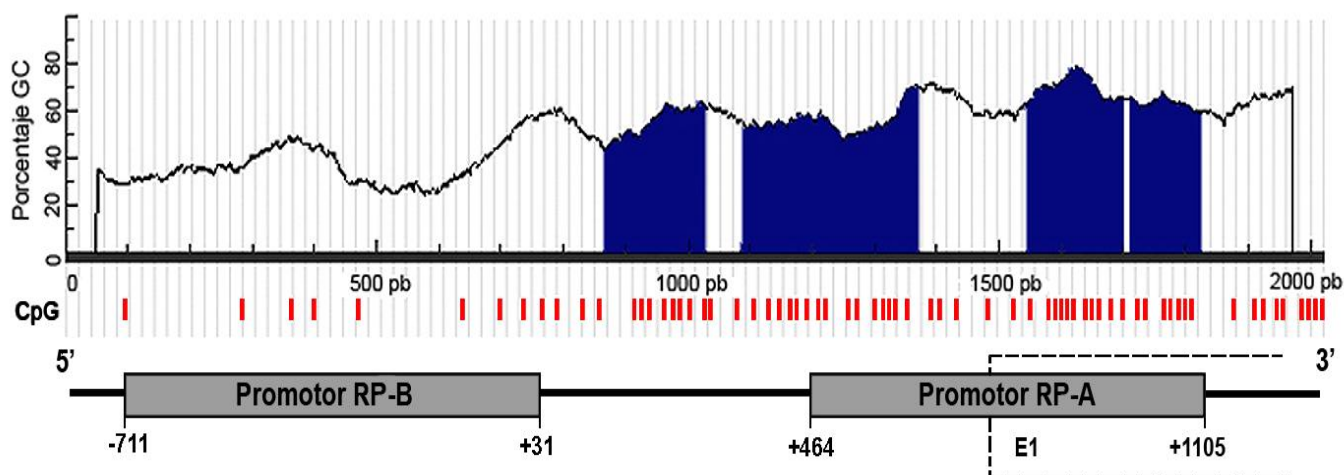


Figura 4: Islas CpG localizadas en la región reguladora del gen del RP. Los ejes de la gráfica superior muestran el porcentaje de GC y el número de pares de bases (pb) junto con los dinucleótidos CpG (en rojo) que se encuentran a lo largo de toda la región reguladora del gen del RP. A partir de la definición de una isla CpG (50% de GC y una alta frecuencia de CpG), la región 5' del gen del RP tiene cuatro posibles islas CpG (marcadas en azul) ubicadas principalmente en el promotor de la isoforma RP-A y en el exón 1 (E1) del gen. Debajo de la gráfica está representada la región 5' con la localización de ambos promotores.

En cáncer de endometrio humano la expresión diferencial de las isoformas del RP se debe a la metilación de dinucleótidos CpG en la región promotora. En este tipo de cáncer el promotor de la isoforma RP-B y no el de la isoforma RP-A se encuentra metilado e inactivo. Esto coincide con la ausencia de la expresión de dicha isoforma, la cual puede ser restaurada con un tratamiento con 5-aza-2'-deoxicitidina (5Aza) (Sasaki *et al.*, 2001), un compuesto muy similar al nucleósido de citidina capaz de incorporar en el DNA durante la replicación e inhibir a las DNMTs (Christman, 2002).

Se ha observado que en muchos pacientes con cáncer de mama se presenta el promotor de la isoforma RP-B metilado, aunque esto no compromete directamente su expresión, por lo que debe haber otros factores que regulen a la baja la expresión del gen del RP. La presencia del RP en los pacientes con cáncer

de mama está relacionado con un pronóstico positivo y una mayor sobrevivencia (Mc Cormack *et al.*, 2008).

Existen algunos tumores de mama que no responden a terapias hormonales y se les conoce como tumores resistentes constitutivos. En un estudio se encontró que en este tipo de tumores el promotor de la isoforma RP-A se encuentra metilado. La expresión de RP-A así como la respuesta a antiprogestinas como RU-486 se restablece con un tratamiento con 5Aza (Wargon *et al.*, 2010).

En algunas líneas celulares de cáncer de próstata los promotores de RE β , RA, RP-A y RP-B están metilados y por tanto inactivados, efecto que puede ser revertido con un tratamiento con 5Aza (Sasaki *et al.*, 2002 y 2003).

En un estudio de varias líneas celulares de cáncer colorectal, de próstata, gástrico, de pulmón y de epidermis se encontró que en todas ellas el promotor de RP-A y de RP-B se encuentran metilados al compararlos con leucocitos, los cuales fueron usados como células control (Tabla 1). Debido a esto se espera que el estado de metilación del RP pueda servir como marcador molecular para el pronóstico de varios tipos de cáncer (Liu *et al.*, 2003).

Por otro lado, en líneas celulares de leucemia humana existe una correlación entre el estado de metilación del RP y la expresión de la metiltransferasa de DNA (DNMT1). Esta enzima es necesaria para mantener la metilación de los dinucleótidos CpG y el consecuente silenciamiento del gen del RP. Además, se observó una hipermetilación tanto en el promotor de la isoforma RP-A como en el de RP-B, por lo que se cree que estas modificaciones epigenéticas son unas de las alteraciones de la leucemia (Liu *et al.*, 2004).

En tumores cerebrales primarios, muchos de los estudios acerca de los patrones de metilación de diversos genes se han realizado en astrocitomas grado IV, debido a la frecuencia a nivel mundial y a la agresividad que presentan. De estos estudios se ha encontrado una larga lista de genes que están silenciados por metilación. Uno de los genes más estudiados es el que codifica para la O6-metilmetiltransferasa de guanina (MGMT). Esta proteína participa en la reparación del DNA removiendo grupos alquilo del oxígeno seis (O6) de la guanina, los cuales pueden aparearse con nucleótidos de timina o reaccionar químicamente con otras

bases nitrogenadas. La metilación del gen de MGMT es un evento frecuente en astrocitomas y se considera un marcador de un mal pronóstico (Burgess *et al.*, 2008).

Estado de metilación de los promotores del RP

Línea celular	Origen	RP-A		RP-B	
		M	U	M	U
SW1116	CRC	+	-	+	-
Colo320	CRC	+	-	+	-
C-1	CRC	+	-	+	-
NED ATE	GC	+	-	+	-
KataII	GC	+	-	+	-
MKN 1	GC	+	-	+	-
MKN 7	GC	+	-	+	-
MKN 28	GC	+	-	+	-
MKN 45	GC	+	-	+	-
MKN 74	GC	+	-	+	-
Lu 65	LC	+	-	+	-
PSN 1	PC	+	-	+	-
A431	EDC	+	-	+	-
HSC64	LC	+	-	+	-
A	WBC	-	+	+	+
B	WBC	-	+	+	+
C	WBC	-	+	+	+
D	WBC	-	+	+	+
E	WBC	-	+	+	+
F	WBC	-	+	+	+

Tabla 1: Patrón de metilación de las isoformas RP-A y RP-B en diferentes líneas celulares de cáncer. La tabla muestra el estudio realizado en líneas celulares de cáncer colorectal (CRC), gástrico (GC), de pulmón (LC), de páncreas (PC) y de epidermis (EDC) y usando como células control los leucocitos (WBC). Tanto el promotor de RP-A como de RP-B se encontraron metilados al compararlos con las leucocitos. M = metilado, U= no metilado. (+) = presencia de una banda, (-) = ausencia de banda (Tomada y modificada de Liu *et al.*, 2003).

En cuanto a receptores a hormonas esteroides en astrocitomas se sabe poco. Chung *et al.* (1996) reportó la presencia del RA en biopsias de pacientes con astrocitomas grado I-IV. En un estudio genómico de genes metilados en

astrocitomas se encontró que el RA estaba metilado en biopsias de pacientes femeninas, pero no en pacientes masculinos (Yu *et al.*, 2004). Por otro lado, se ha reportado que en tumores de bajo grado de evolución se expresa el RE β y que esta expresión desaparece en tumores de mayor grado (III y IV) (Batistatou *et al.*, 2004). En un estudio de patrones de metilación en glioblastomas se encontró que el RE está hipermetilado y dicha metilación es más frecuente en tumores de individuos de más de 40 años. Aparentemente estos cambios en el patrón de metilación del RE están relacionados con la edad del paciente (Li *et al.*, 1998). Con respecto al RP se desconoce si el gen se encuentra metilado en estos tumores y si esto tiene alguna relevancia en la expresión diferencial de sus isoformas. Se sabe que este receptor se expresa en muestras de pacientes con astrocitomas de diferente grado de evolución tumoral y que la expresión del RP es mayor en astrocitomas de grado IV (Khalid *et al.*, 1997).

4.7. Papel de la progesterona y sus receptores en el crecimiento de los astrocitomas

En nuestro laboratorio se ha caracterizado el patrón de expresión de las isoformas del RP en astrocitomas humanos. Se ha observado que el RP se expresa principalmente en biopsias de tumores de grado III y IV (Assimakopoulou *et al.*, 1998) y que la forma predominante es la RP-B (González-Agüero *et al.*, 2001). En líneas celulares de astrocitomas grado III (U373) y IV (D54) se ha observado que la P4 (10 nM) induce la proliferación de las células y el tratamiento con el antagonista del RP (RU486, 10 μ M) bloquea el efecto de la hormona, lo que sugiere que el efecto de la P4 es a través de sus receptores intracelulares (González-Agüero *et al.*, 2007). Por otro lado, la sobre-expresión de la isoforma RP-A en la línea U373 disminuye el número de células en presencia de P4, sugiriendo que el RP-A tiene un efecto inhibitor sobre el crecimiento celular cuando es activada por su ligando. Además, en la línea celular de grado III se expresa principalmente la isoforma RP-B en una proporción RP-B/RP-A de 3:1, mientras que RP-A se expresa

mayoritariamente en las de grado IV en una relación RP-B/RP-A de 0.66:1 (Cabrera-Muñoz *et al.*, 2009).

Por otro lado, el E2 y la P4 regulan de manera diferencial la expresión de las isoformas del RP en dichas líneas celulares. El E2 induce la expresión de ambas isoformas del receptor en la línea U373 pero no en la D54. El tratamiento con el antagonista del ER (ICI 182,780) bloquea el incremento en el contenido de las isoformas inducido por E2 en la línea U373. La P4 no modifica el contenido del RP, pero al ser administrada después del tratamiento con E2 se reduce el contenido de las isoformas del RP, efecto que es bloqueado con RU486 (Cabrera-Muñoz *et al.*, 2009). Por lo tanto, existe una regulación diferencial de las isoformas del RP que depende del grado de evolución de las células, aunque se desconoce el mecanismo molecular por el cual se lleva a cabo dicha regulación (Camacho-Arroyo, 2003). Uno de los posibles mecanismos de regulación es la metilación del DNA, pero se desconoce si el RP es regulado por metilación en astrocitomas humanos.

V. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En líneas celulares de astrocitomas humanos existe una regulación diferencial de la expresión de las isoformas del RP dependiente del grado de evolución del tumor. La isoforma RP-B predomina en las líneas de astrocitomas grado III, mientras que la isoforma RP-A se expresa principalmente en las de grado IV (Camacho-Arroyo, 2003; Cabrera-Muñoz *et al.*, 2009).

La represión en la expresión del RP en distintos tipos de líneas celulares cancerosas ocurre mediante la metilación de sus regiones promotoras (Liu *et al.*, 2003). Sin embargo, se desconoce si la expresión diferencial de las isoformas del RP en astrocitomas humanos es regulada por mecanismos de metilación.

VI. HIPÓTESIS

Si en líneas celulares de astrocitomas humanos existe una regulación de la expresión de las isoformas del RP por un mecanismo de metilación, entonces el tratamiento con el agente hipometilante 5Aza incrementará su expresión.

VII. OBJETIVO GENERAL

Conocer el papel de la metilación en la expresión diferencial de las isoformas RP-A y RP-B en líneas celulares de astrocitomas humanos.

Objetivos particulares

- Relacionar el estado de metilación del gen del RP con su expresión en las líneas celulares U373 (III) y D54 (IV) mediante el tratamiento con 5Aza.
- Estudiar los cambios en el contenido de las isoformas RP-A y RP-B en células U373 y D54 tratadas con 5Aza.
- Analizar el efecto de la 5Aza sobre el crecimiento de las células de las líneas U373 y D54.

VIII. METODOLOGÍA

8.1. Cultivo de líneas celulares

La línea celular U373 o U373-MG (ATCC: HTB 17), derivada de astrocitoma humano grado III, proviene de la biopsia de un hombre caucásico de 61 años y la línea D54 o D54-MG (derivada de astrocitoma grado IV) proviene de una biopsia de un hombre de 53 años (Bigner *et al.*, 1981; Wikstran *et al.*, 1983). La línea celular D54 fue obtenida por Andrés Gutiérrez (INR, México) del laboratorio del Dr. Sontheimer (Birmingham, Alabama).

Las dos líneas celulares se crecieron en medio DMEM (In vitro, S.A., México) bajo condiciones estandarizadas de 37°C y una atmósfera de 95% aire y 5% de CO₂. El medio fue complementado con suero fetal bovino con hormonas al 10%, 1

mM de piruvato, 2mM de glutamina y 0.1 mM de aminoácidos no esenciales (Invitrogen, USA).

Las U373 son células más diferenciadas que las D54 y se distinguen de éstas por presentar extensiones celulares no ramificadas y por tanto tienen una morfología similar a la de los astrocitos (ATCC). En cambio, las células de la línea D54 tienen muy pocas prolongaciones y morfológicamente se observan dos fenotipos, el poligonal y el epitelioide (Wilkstran *et al.*, 1983) (Figura 5).

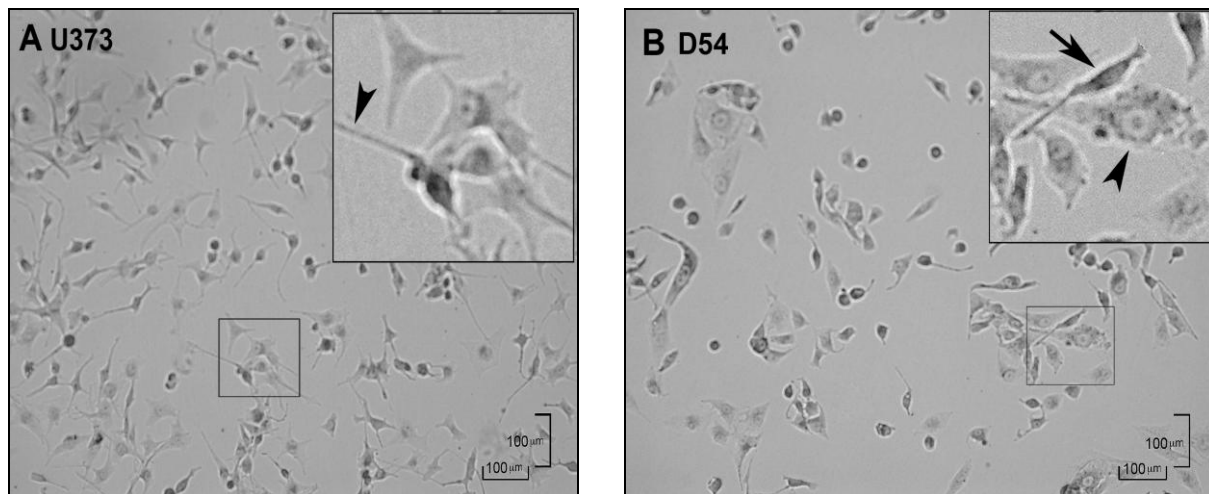


Figura 5: Imágenes de las líneas celulares U373 y D54. **A:** Células de la línea U373 (grado III) de mayor diferenciación que presentan una morfología estrellada con prolongaciones bien definidas (cabeza de flecha) y con una cierta semejanza a los astrocitos. **B:** Células de la línea D54 (grado IV) que tienen una menor cantidad de extensiones y su morfología es poligonal (cabeza de flecha) o de tipo epitelial (flecha).

8.2. Tratamiento con 5-aza-2'-deoxicitidina (5Aza)

Para estudiar el papel de la metilación sobre la expresión del gen del RP se hicieron cultivos celulares de las líneas de astrocitoma grados III y IV hasta obtener una confluencia del 30%. Posteriormente, se trataron con 5Aza (Sigma Aldrich, USA), un agente hipometilante e inhibidor de las DNMT. Este compuesto es muy similar al nucleósido de citidina, es capaz de incorporarse en el DNA durante la replicación y esto inhibe a las DNMT, ya que la droga forma enlaces irreversibles con la enzima (Christman, 2002). De esta manera, el tratamiento con 5Aza induce la expresión de muchos genes que se encuentran silenciados por metilación (Bolander, 2004).

El fármaco se utilizó a una concentración de 5 μ M y el tratamiento se realizó durante un período de cuatro días renovando el medio y la 5Aza cada 24 horas (Zhang *et al.*, 2008; Götze *et al.*, 2009; Waha *et al.*, 2010). A las células tratadas con vehículo se les agregó agua MilliQ estéril, dado que fue el disolvente utilizado para hacer la solución del fármaco.

8.3. Extracción de RNA y expresión del RP

Una vez realizados los tratamientos se procedió a extraer el RNA de las células con el fin de conocer la expresión del gen. Para ello se utilizó el RNAeasy Mini Kit (Qiagen, Alemania). Este protocolo consistió en lisar y homogeneizar a las células con un amortiguador desnaturante de isotiocianato de guanidina con el fin de inhibir las RNAsas y evitar la degradación de los ácidos nucleicos. A la muestra se le añadió etanol al 70% para incrementar las condiciones de unión del RNA a la membrana de sílica de la columna. Después se filtró por la columna y el RNA que se unió a la membrana se lavó con etanol y se eluyó con agua libre de RNAsas.

Una vez obtenido el RNA, éste se cuantificó midiendo la absorbancia a 260 nm en un NanoDrop (Thermo Scientific, USA). La cantidad de RNA obtenido bajo estas condiciones fue de aproximadamente 1 μ g/ μ l en un volumen final aproximado de 50 μ l. Con el RNA purificado se realizó una transcripción reversa para obtener el cDNA del gen de interés utilizando la enzima transcriptasa reversa (Invitrogen, USA). Finalmente, se hizo una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con oligonucleótidos diseñados para amplificar el RP total (RP-AB) y la isoforma RP-B (Tabla 2). Los productos se separaron en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio para observar el grado de expresión del RP.

8.4. Extracción de proteínas y Western Blot

Para estudiar el contenido del RP a nivel de proteína se hizo un análisis de Western Blot. Para ello se trataron a las células U373 y D54 con vehículo y con 5Aza como se describió previamente y se extrajo la proteína total. Las células fueron lisadas con buffer de RIPA que contiene los inhibidores de proteasas aprotinina (22 μ g/ml),

PMSF (1mM) y EDTA (1mM). Las muestras se centrifugaron a 14,000 rpm a 4°C durante 15 min y se cuantificaron por el método de Bradford (Bio-Rad).

Oligonucleótidos de expresión del RP.

Nombre	Secuencia	Tm	Tamaño (pb)
RP-AB FW	GCTCACAGCGTTTCTATCAACTT	56	138
RP-AB RV	TCACCATCCCTGCCAATATCT	56	
RP-B FW	AGCCGCAGGTCCGTT	56	157
RP-B RV	CACGTCCGACAGCGACT	56	
18S FW	CGAACGTCTGCCCTATCAAC	56	120
18S RV	TTGGATGTGGTAGCCGTTTC	56	

Tabla 2: Listado de oligonucleótidos diseñados para la expresión del RP y del gen del RNA ribosomal 18S. En la tabla está representado el nombre del oligonucleótido sentido (FW) y antisentido (RV), la secuencia, la temperatura de fusión (Tm) y el tamaño del fragmento esperado.

Las muestras fueron hervidas durante diez minutos y se tomaron 140 µg de proteínas totales en buffer de carga para separarlas por electroforesis en un gel SDS-desnaturalizante a 80 V. Las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (Millipore, USA) en una cámara semihúmeda durante 5 h a 40 mA por gel. Una vez transferidas, la membrana se incubó a 4°C con una solución de bloqueo al 5% (GE Healthcare, UK) durante 12 h. Posteriormente se incubó con una mezcla de anticuerpos contra las dos isoformas del RP uno policlonal de conejo Ab-13 (Thermo Scientific, USA) y otro monoclonal de ratón AB-52 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA) durante 48 h a 4°C. Los anticuerpos fueron usados a una concentración de 3.33 µg/ml y 0.66 µg/ml respectivamente. Transcurrido ese tiempo se hicieron tres lavados con TBS-Tween (0.1%) durante 5 min para luego incubar la membrana durante 45 min a temperatura ambiente con una mezcla de anticuerpos secundarios (Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA) levantados en conejo (1:7500) y en ratón (1:5000) y conjugados con peroxidasa. Se hicieron nuevamente tres

lavados con TBS-Tween para después identificar las proteínas mediante quimioluminiscencia (Millipore, USA) y revelar por autoradiografía.

Para corregir las posibles diferencias en la proteína cargada se utilizó la proteína α -tubulina como control, dado que no se modifica su contenido con los tratamientos empleados. La membrana fue lavada con glicina ácida (0.1 M, pH 2.5) a 4°C durante toda la noche y se bloqueó con leche descremada al 5% por 12 h para después incubarla con anticuerpo monoclonal de ratón contra α -tubulina (1:5000, Sigma Aldrich, USA) durante 24 h a 4°C. Al igual que para el RP, la membrana se lavó con TBS-Tween y se incubó con un anticuerpo secundario levantado en ratón (1:5000, Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA) para luego revelarla por autoradiografía.

8.5. Determinación del número celular

Para estudiar el efecto de la 5Aza sobre el crecimiento de las líneas celulares U373 y D54, se realizaron ensayos para determinar el número de células. Para ello se sembraron de cada línea celular aproximadamente 3000 células por pozo en una caja de 48 pozos (20 por línea). Al cabo de 24 horas se realizó un cambio de medio por DMEM sin rojo fenol y suplementado al 10% con suero fetal bovino sin hormonas. Tras 24 horas sin un estímulo hormonal, se pusieron los siguientes tratamientos: vehículo (ciclodextrina 0.02%), P4 (10 nM), 5Aza (5 μ M) y P4+5Aza y se contaron las células desde el día cero hasta el día cuatro. El conteo se realizó en una cámara de Neubauer y se empleó azul Tripán (0.4%) para determinar la viabilidad celular. Para cada línea celular se realizaron cuatro experimentos independientes.

8.6. Análisis estadístico

Los datos obtenidos de la expresión y del contenido proteínico del RP fueron cuantificados por densitometría utilizando el programa Chemilmager 4400 (Protein Simple, USA) y analizados en el programa GraphPad Prism 4.00 (GraphPad Software, Inc., USA). Para el análisis de la expresión del RP y de los datos obtenidos en los ensayos de crecimiento celular se realizó una ANOVA de una sola

vía seguida de una prueba de comparaciones múltiples de Tukey. En todas las pruebas estadísticas se utilizó un intervalo de confianza del 95%, por lo que se consideraron como estadísticamente significativos aquellos datos que tuvieron un valor de $p < 0.05$.

IX. RESULTADOS

9.1. Papel de la metilación en la expresión del RP en las líneas celulares U373 y D54

Para estudiar la expresión del RP y su posible regulación a través de mecanismos de metilación, se realizó un ensayo RT-PCR con RNA extraído de células tratadas con vehículo (V) y con el agente hipometilante 5Aza ($5 \mu\text{M}$), droga que inhibe a las DNMT. El cDNA se empleó para hacer una reacción de PCR con oligonucleótidos específicos para el RP total y para la isoforma RP-B. Como control de expresión se utilizó al gen del RNA ribosomal 18S.

Se realizaron cinco experimentos independientes y en todos se observó que en la línea U373 hubo un aumento significativo en la expresión del RP total al tratar a las células con 5Aza. El incremento fue de 2.8 veces respecto al V. En contraste a lo observado en U373, en la línea D54 no hubo ningún cambio significativo (Figura 6).

Para el caso de la expresión del mRNA de RP-B se observó también un aumento significativo en las células U373 tratadas con 5Aza. Este incremento fue de 2.4 veces en comparación con V. En la línea D54 se observó una tendencia a aumentar la expresión de RP-B, sin embargo, el incremento no fue estadísticamente significativo (Figura 7).

Debido a que se encontraron cambios en la expresión del mRNA del RP al tratar con 5Aza, se decidió estudiar si estos cambios se veían reflejados a nivel de la proteína. Al cuantificar el contenido de proteína en ambas líneas celulares tratadas con 5Aza se encontró que la expresión de la isoforma RP-B aumentó en la

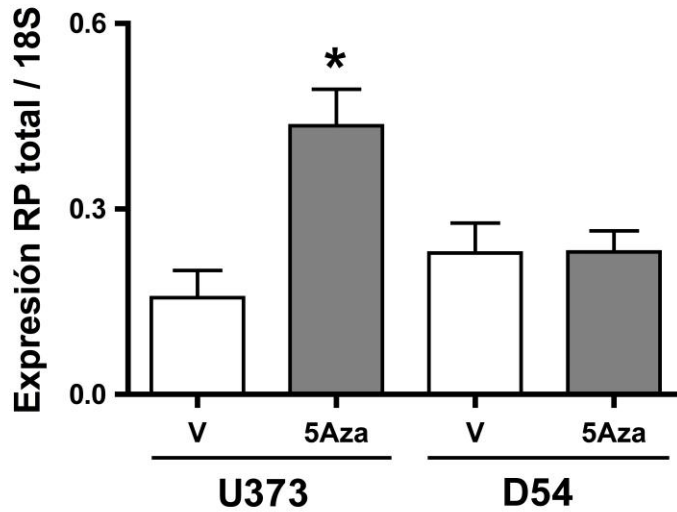
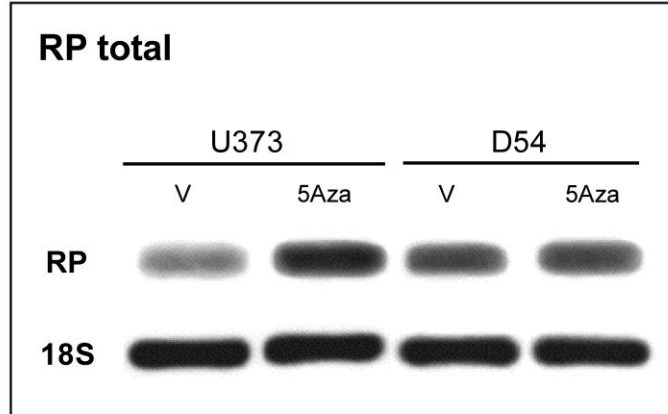


Figura 6. Expresión del mRNA del RP total en las líneas celulares U373 y D54 tratadas con 5Aza (5 μ M). Se realizó una retrotranscripción a partir de 5 μ g de RNA total y se amplificó por PCR con oligonucleótidos específicos para el RP total y el RNA ribosomal 18S. El panel superior es una imagen representativa de la expresión del mRNA del RP total en las dos líneas celulares tratadas con vehículo (V) y con 5Aza, así como sus respectivos controles de expresión (18S). La gráfica inferior representa el análisis densitométrico de la expresión del mRNA del RP total con respecto a la expresión del 18S. El tratamiento con 5Aza provocó un aumento significativo en la expresión del RP en la línea U373 (*). En el caso de D54 no se observó ningún cambio significativo en la expresión del receptor. La gráfica muestra la $\bar{x} \pm$ E.S. n=5; *p <0.01.

línea U373, mientras que en la isoforma RP-A no se observaron cambios significativos (Figura 8). En la línea D54 no hubo cambios significativos en ninguna

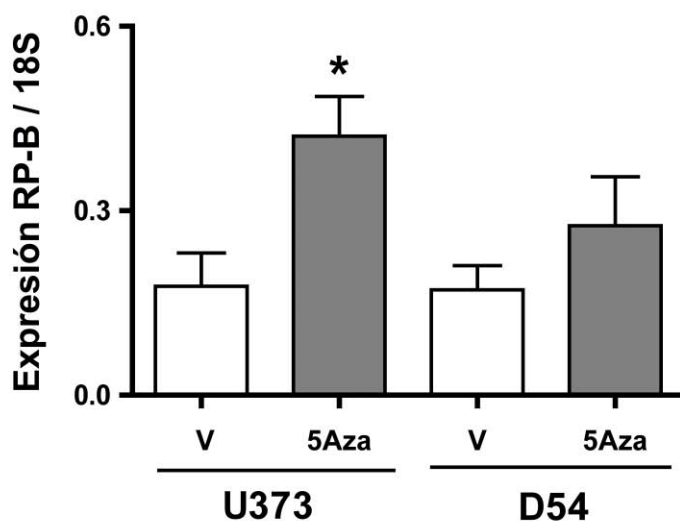
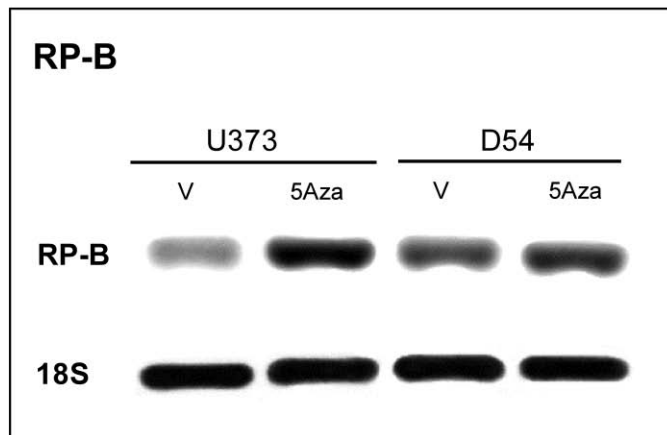


Figura 7. Expresión del mRNA de RP-B en las líneas celulares U373 y D54 tratadas con 5Aza (5 μ M). Se realizó una retrotranscripción a partir de 5 μ g de RNA total y se amplificó por PCR con oligonucleótidos específicos para RP-B y el RNA ribosomal 18S. El panel superior es una imagen representativa de la expresión del mRNA de la isoforma RP-B en las dos líneas celulares tratadas con vehículo (V) y con 5Aza. También se muestran los respectivos controles de expresión (18S). La gráfica inferior representa el análisis densitométrico de la expresión del mRNA de RP-B con respecto a la expresión de 18S. El tratamiento con 5Aza provocó un aumento significativo en la expresión de RP-B en la línea U373 (*). En el caso de D54 se observó una tendencia a incrementar la expresión, pero ésta no fue significativa. La gráfica muestra la $\bar{x} \pm E.S.$ n=5; *p <0.05.

de las dos isoformas del receptor (Figura 8). Estos resultados sugieren que en la línea U373 los niveles del mRNA de la isoforma RP-B se ven reflejados a nivel de la

proteína al tratar a las células con 5Aza y que los cambios observados en la expresión del mRNA del RP total se deben principalmente a cambios en la expresión de RP-B. En la línea D54, los niveles del mRNA del RP también se reflejan a nivel de la proteína, aunque no haya cambios en la expresión al tratar con 5Aza.

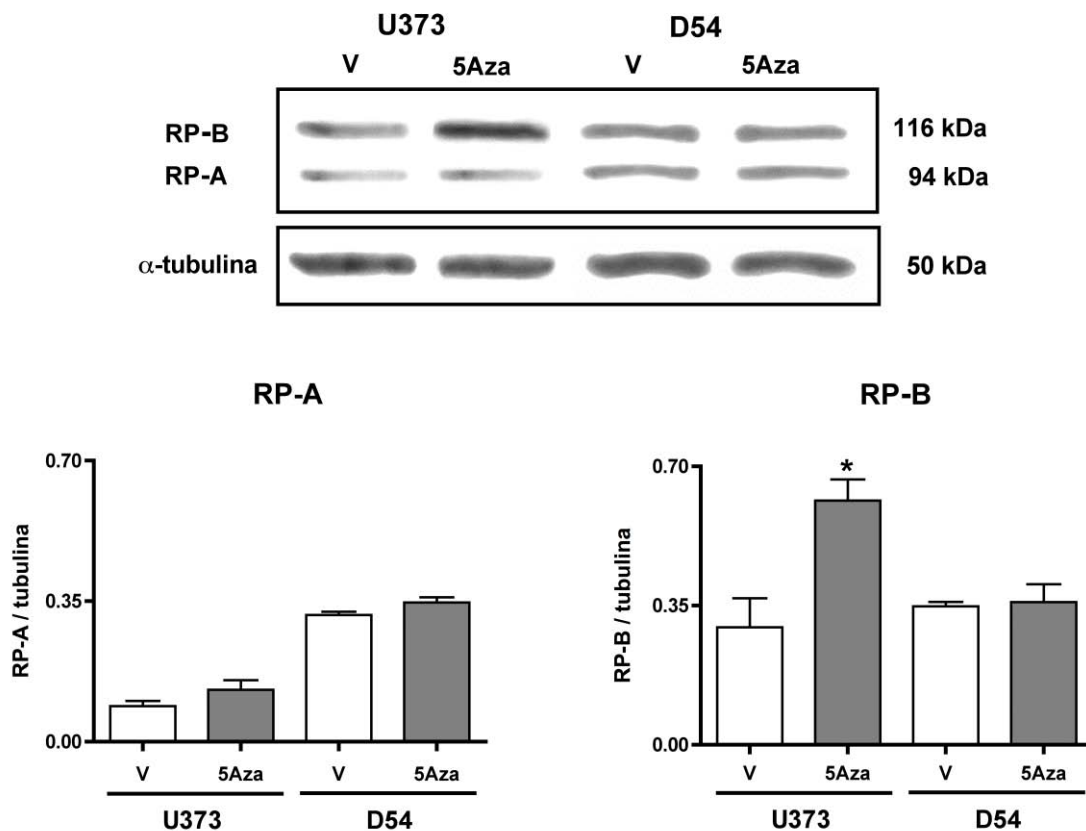


Figura 8: Contenido de las isoformas RP-A y RP-B en las líneas celulares U373 y D54 tratadas con 5Aza (5 μ M). Las células fueron lisadas y las proteínas totales fueron separadas por electroforesis en un gel SDS desnaturizante. Se transfirieron a una membrana y se incubaron con anticuerpos para el RP. En la parte superior se muestra una imagen representativa de un Western Blot con las isoformas del RP para cada una de las líneas celulares y la α -tubulina que fue utilizada como control de carga. Se muestran también los pesos de cada una de las proteínas. En la parte inferior de la figura se puede observar la gráfica del análisis densitométrico de la expresión de cada isoforma con respecto a la expresión de la α -tubulina. En el contenido de la isoforma RP-A no hubo cambios significativos, mientras que para la isoforma RP-B hubo un incremento significativo en la línea U373 tratada con 5Aza. * $p < 0.05$, $\bar{x} \pm ES$ n=3.

De los resultados obtenidos para las células tratadas con V (Figura 8), en la línea U373 la isoforma RP-B se encuentra 2.5 veces más expresada que RP-A, mientras que en D54 la proporción es equivalente (1:1). Esta proporción de las isoformas del RP se mantuvo similar en ambas líneas celulares de acuerdo a lo reportado por estudios previos del laboratorio (3:1 para U373 y 0.66:1 para D54, Cabrera-Muñoz *et al.*, 2009). Por otro lado, la isoforma RP-A incrementa su contenido en D54 con respecto a U373 en las células tratadas con V. Esto nos sugiere que la expresión de esta isoforma se modifica conforme aumenta el grado de evolución del tumor. En cambio, el contenido de RP-B se mantiene igual en ambas líneas celulares independientemente del grado de evolución del tumor.

9.2. Efecto de la P4 y la 5Aza sobre la proliferación de las células U373 y D54

En diferentes líneas celulares de cáncer se ha observado que la 5Aza previene la proliferación de las células (Zhu *et al.*, 2004; Chai *et al.*, 2008; Luszczek *et al.*, 2010), por lo que se quiso ver si este compuesto también bloqueaba el crecimiento de las células de las líneas U373 y D54. Para ello se trataron a las células con V, P4, 5Aza y P4+5Aza y se realizó un conteo celular.

Al realizar el conteo celular se encontró que en la línea U373 la P4 induce la proliferación de las células a partir del segundo día de tratamiento y este incremento fue significativamente diferente en comparación con el resto de los tratamientos (Figura 9). El efecto de la P4 sobre el crecimiento de las células ya se había observado previamente en el laboratorio (González-Agüero *et al.*, 2007). Por otro lado, el tratamiento con 5Aza y el tratamiento conjunto, Aza+ P4, disminuyeron el número de células en comparación con el V (Figura 9).

En cuanto a la línea D54, se encontró que la P4 indujo la proliferación celular a partir del día tres de tratamiento, pero este incremento es significativo al cuarto día en comparación con el tratamiento con 5Aza y P4+5Aza. Al día cuatro, el tratamiento con 5Aza disminuyó significativamente el número de células en comparación con el V y éste efecto no se modificó al tratar de manera conjunta con

P4 (Figura 10). Estos datos nos sugieren que la hipometilación del DNA inhibe la proliferación de las células derivadas de astrocitomas humanos incluso en presencia de P4.

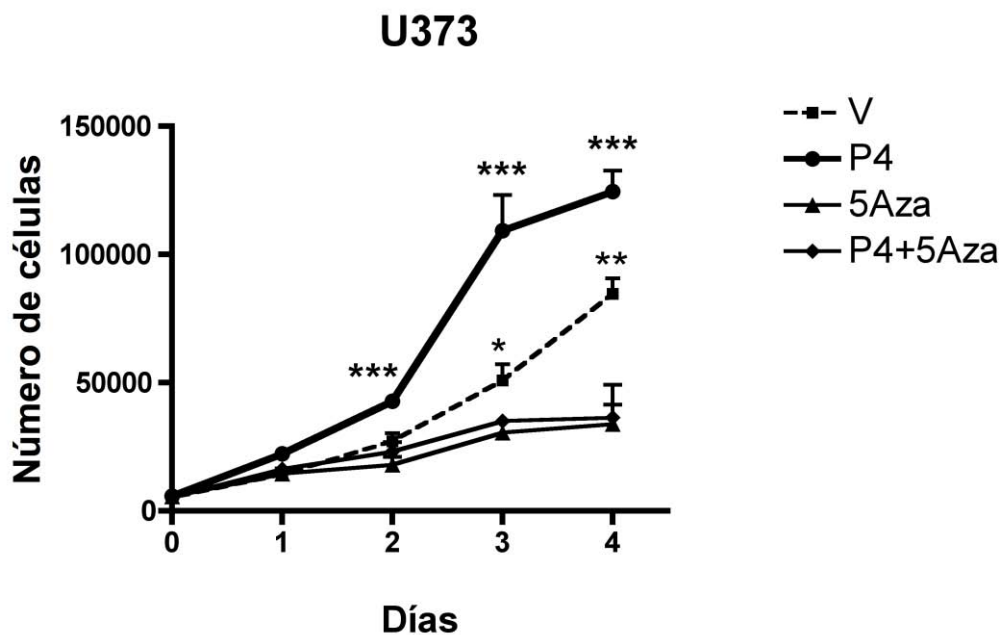


Figura 9: Efecto de la P4 y la 5Aza sobre el número de células cultivadas de la línea U373. Las células fueron tratadas con P4 y 5Aza y contadas cada 24 horas durante cuatro días consecutivos. El tratamiento con P4 incrementó significativamente el número de células a partir del segundo día en comparación con los demás tratamientos. Los tratamientos con 5Aza y P4+5Aza redujeron significativamente el número de células en comparación con el V a partir del tercer y cuarto día respectivamente. * $p < 0.05$ vs. 5Aza, ** $p < 0.05$ vs. 5Aza y P4+5Aza, *** $p < 0.05$ vs. V y $p < 0.01$ vs. 5Aza y P4+5Aza. $\bar{x} \pm E.S.$ $n=4$.

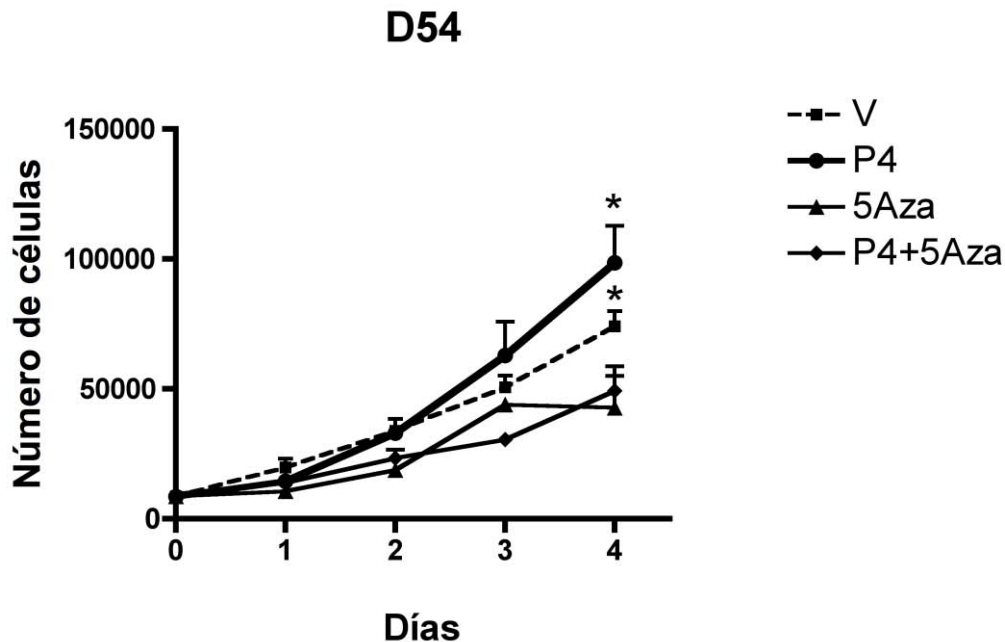


Figura 10: Efecto de la P4 y la 5Aza sobre el número de células cultivadas de la línea D54. Las células fueron tratadas y contadas cada 24 horas durante cuatro días consecutivos. El tratamiento con P4 incrementó significativamente al cuarto día en comparación con el tratamiento con 5Aza y el tratamiento conjunto. Al cuarto día del tratamiento con 5Aza y con P4+5Aza se redujo significativamente el número de células en comparación con el V. * $p < 0.05$ vs. 5Aza y P4+5Aza. $\bar{x} \pm$ E.S. $n=4$.

El tratamiento con 5Aza es citotóxico y puede incluso inducir apoptosis en diferentes líneas celulares de cáncer (Nieto *et al.*, 2004; Momparler, 2005). Para verificar que el agente hipometilante no estuviera dañando a las células, se cuantificó la viabilidad de las mismas utilizando una tinción con azul Tripán. En la Figura 11 se puede observar que la viabilidad de las células tanto de la línea U373 como de la D54 se encuentra por arriba del 90%. Esto quiere decir que las células tratadas con 5Aza a dicha concentración tienen la misma viabilidad que aquellas tratadas con V y con P4.

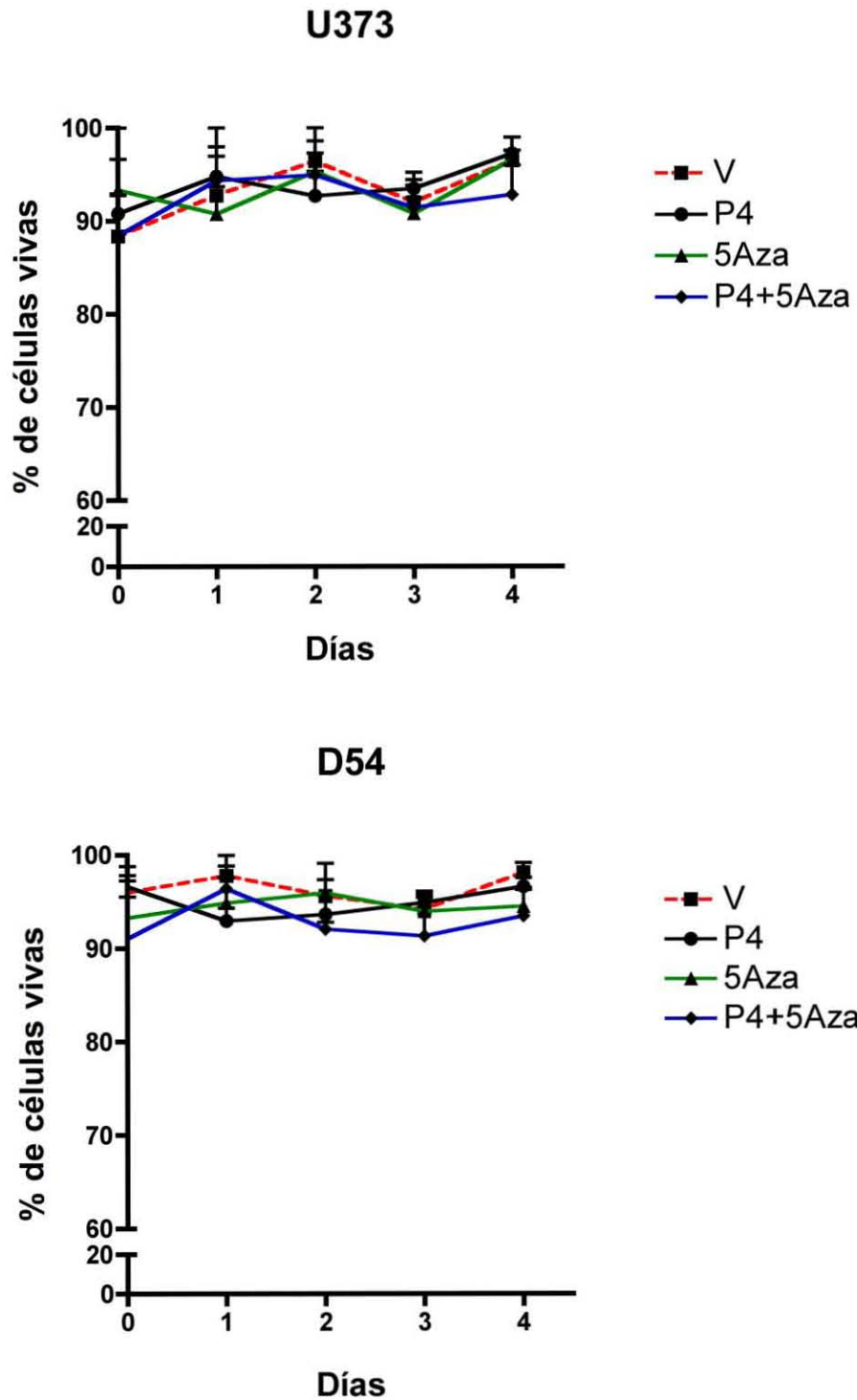


Figura 11: Viabilidad de las células de la línea U373 y D54 tratadas con P4 y 5Aza. El porcentaje de células vivas que se cuantificó utilizando la tinción de azul Tripán es de más del 90% para todos los tratamientos utilizados en las dos líneas celulares. $\bar{x} \pm E.S.$ n=4.

X. DISCUSIÓN

Los astrocitomas, unos de los tumores más agresivos del Sistema Nervioso Central, son de origen glial y representan las neoplasias primarias más frecuentes en seres humanos. En este tipo de cáncer se ha detectado que la expresión del RP es directamente proporcional al grado de evolución del tumor. También se ha observado que las isoformas del receptor se expresan de manera diferencial y que la isoforma RP-B se expresa predominantemente en astrocitomas de grados III y IV. Esto ha sugerido que la P4 puede estar involucrada en el desarrollo de los gliomas (Carroll *et al.*, 1995; Khalid *et al.*, 1997; González-Agüero *et al.*, 2001).

Dado que la P4 puede ejercer distintas funciones de acuerdo a la expresión de las isoformas del RP, es importante conocer los mecanismos de regulación de la expresión de las isoformas del receptor. Uno de los mecanismos propuestos para explicar la regulación diferencial del RP en los astrocitomas es la metilación del DNA.

La metilación del DNA es una de las modificaciones epigenéticas más estudiadas debido a su importancia en el desarrollo del cáncer. Las células cancerosas se caracterizan por tener una metilación alterada del DNA, pues se observa una hipometilación globalizada y una hipermetilación localizada en los promotores de ciertos genes (Portela y Esteller, 2010). Muchos de los estudios de metilación emplean el análogo de la citosina, la 5Aza, para inhibir las metiltransferasas de DNA y lograr la expresión de genes hipermetilados. Se sabe que a concentraciones bajas la droga modifica el perfil de expresión en células cancerosas, cambios que favorecen la diferenciación, reducen la proliferación y/o incrementan la apoptosis de las células tumorales (Jabbour *et al.*, 2008).

Los cambios en la expresión del RP provocados por el tratamiento con 5Aza se han observado en distintos tipos de cáncer (Sasaki *et al.*, 2001 y 2003; Wargon *et al.*, 2010). Sin embargo, en astrocitomas se desconoce la regulación por metilación de dicho gen. En las líneas celulares U373 y D54 se expresan de manera diferencial ambas isoformas del receptor en una proporción RP-B/RP-A de 3:1 y de 0.66:1 respectivamente. Esta expresión diferencial puede estar mediada por la

metilación de las regiones promotoras del gen del RP. Los resultados obtenidos nos muestran que en la línea U373 existe una relación inversa entre la expresión del RP y la metilación, ya que al tratar a las células con 5Aza se incrementa la expresión del RP total y de la isoforma RP-B. Por lo tanto, la metilación contribuye a la reducción en la expresión del gen en estas células. Esto se ha observado también en el gen de una fosfatasa de MAPK (DUSP4/MAPK) que disminuye su expresión al encontrarse metilado en distintas líneas celulares de gliomas (Waha *et al.*, 2010).

En la línea U373 la relación RP-B/RPtotal es de 0.97:1, lo que nos indica que al tratar con 5Aza el principal aumento en la expresión del RP total se debe al aumento en la expresión de RP-B. Por lo tanto, la expresión de RP-A no se modifica al desmetilar el DNA. Esto se ve reflejado a nivel de la proteína donde únicamente la isoforma RP-B incrementa su contenido al tratar con 5Aza. Este aumento en la expresión de la isoforma RP-B a nivel del mRNA y de la proteína al desmetilar el DNA ya se ha observado en otros tipos de cáncer (Xiong *et al.*, 2005; Mc Cormack *et al.*, 2008; Jichan *et al.*, 2010). En nuestro modelo de estudio, los resultados obtenidos indican que la expresión de la isoforma RP-B en la línea U373 es sensible a una regulación por metilación.

En la línea celular D54 no hubo cambios significativos en la expresión del gen del RP al tratar con 5Aza. Esto puede deberse a que, al ser una línea de mayor grado de evolución, la regulación por mecanismos de metilación del DNA se pierde. No obstante, también puede ser que la línea D54 sea más resistente a la droga. Esto puede ocurrir si las células son deficientes en la cinasa de deoxicitidina que fosforila a la 5Aza a su forma activa o si tiene incrementada la actividad de la deaminasa de citidina que inactiva a la 5Aza. En otras ocasiones se puede presentar resistencia si hay un aumento intracelular del nucleósido trifosfatado dCTP que compite con la 5Aza para incorporarse al DNA durante la fase S del ciclo celular (Momparker, 2005). Además de estos mecanismos, la resistencia generada por algunas líneas celulares cancerosas puede deberse a una amplificación del gen de la DNMT3B que les confiere menor sensibilidad a la 5Aza, tal como se ha observado en células de cáncer de mama y de páncreas (Simó-Riudalbas *et al.*,

2011). Sin embargo, se desconoce el perfil de expresión de las DNMT en las líneas celulares estudiadas.

Por otro lado, en la línea D54 no se encontraron cambios a nivel de la proteína de ninguna de las dos isoformas. Se ha observado que en estas células la expresión de las isoformas es prácticamente equivalente (Cabrera-Muñoz *et al.*, 2009), lo que puede indicar que a un mayor grado de evolución se pierde la regulación diferencial por metilación y por ello no se observan diferencias en el contenido de las isoformas del RP al tratar con 5Aza. Incluso, se ha observado una pérdida de regulación de la expresión del RP por E2 en esta línea celular (Cabrera-Muñoz *et al.*, 2009). Sin embargo, también pueden estar involucrados otros mecanismos de regulación de la expresión génica como la acetilación de las histonas, pues se ha visto que los tratamientos con inhibidores de HDAC actúan de manera sinérgica con la 5Aza para inducir la expresión de genes (Yang *et al.*, 2001; Zhu y Otterson, 2003; Yin *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2011).

En cáncer de endometrio y de mama la pérdida de la expresión de RP-B se ha asociado al desarrollo y proliferación del tumor. Este silenciamiento en la expresión se ha relacionado a la metilación de la región promotora de dicha isoforma (Sasaki *et al.*, 2001; Xiong *et al.*, 2005; Mc Cormack *et al.*, 2008). En la línea U373 la expresión de RP-B y no la de RP-A está regulada por metilación. Sin embargo, esta regulación se pierde en una línea derivada de un tumor de mayor grado de evolución, por lo que la isoforma RP-B puede estar jugando un papel importante en el desarrollo de los astrocitomas. Esto correlaciona con lo observado en biopsias de tumores en los que se encontró que RP-B es la isoforma predominante en astrocitomas de grados III y IV (González-Agüero *et al.*, 2001).

Los tratamientos con 5Aza no sólo modifican los perfiles de expresión, sino también inhiben la proliferación celular en otros tipos de cáncer y al parecer inducen el arresto del ciclo celular en la fase G2/M (Nieto *et al.*, 2004; Chai *et al.*, 2008; Luszczyk *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2011). Se sabe que el tratamiento con 5Aza puede inducir apoptosis, pero también es capaz de inducir una respuesta de daño al DNA a través de la activación de p53, lo que en muchas ocasiones conlleva a un arresto de la proliferación celular (Nieto *et al.*, 2004; Zhu *et al.*, 2004). Al tratar a las

células de la líneas U373 y D54 con 5Aza el número de células se redujo significativamente, pero el 90% de las células eran viables con todos los tratamientos utilizados. La viabilidad y la reducción en el número de células al tratar con 5Aza a la dosis de 5 μ M podría deberse a un arresto del ciclo celular. Sin embargo, habría que determinar la fase del ciclo donde puedan estar arrestadas y si hay cambios en la muerte celular de tipo apoptótica.

Por otro lado, trabajos previos de nuestro laboratorio demostraron que la P4 induce la proliferación de ambas líneas celulares (González-Agüero *et al.*, 2007) y se sabe que esta hormona puede regular la proliferación de otro tipo de tumores (Yu *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2011). Sin embargo, al tratar a las células con P4+5Aza el número de células se redujo igual que el tratamiento con 5Aza. Incluso en la línea U373, donde hay un incremento en la isoforma RP-B al tratar con el agente hipometilante, la hormona no tiene un efecto sobre el número de células. En una línea celular de cáncer de mama que es RE- α negativa se observó que la 5Aza y un inhibidor de HDAC inducen la expresión del receptor y arrestan las células en la fase S del ciclo celular, arresto que es parcialmente atenuado por el tratamiento con estradiol. Además, la inhibición en la proliferación se incrementa al tratar a las células con un antagonista del RE (Tang *et al.*, 2005; Fan *et al.*, 2008). Sería interesante estudiar si en las líneas celulares de astrocitomas el tratamiento conjunto de 5Aza y el antagonista RU486 actúan sinérgicamente para inhibir el crecimiento de las células.

El tratamiento con 5Aza también es importante para conocer su papel antineoplásico en distintos tipos de cáncer. Aunque la 5Aza ya es empleada como tratamiento para el síndrome mielodisplásico y para distintos tipos de leucemias, todavía se conoce muy poco su efecto en tumores sólidos (Momparler, 2005). En las líneas celulares de astrocitomas la 5Aza al igual que el tratamiento conjunto con P4 inhibieron el crecimiento celular. Esto puede ser relevante a nivel terapéutico sobre todo para aquellas pacientes que requieren de una terapia de reemplazo hormonal durante la menopausia.

Nuestros resultados muestran que la metilación es un mecanismo que participa en la regulación de la expresión del RP en líneas celulares derivadas de

astrocitomas. Sin embargo, estos estudios no nos permiten determinar a qué nivel se encuentra metilado el gen del RP y si efectivamente la isoforma RP-B es la que se encuentra más metilada. Para ello se requieren estudios, como la secuenciación por bisulfito, que permitan conocer el patrón de metilación que tiene el gen del RP con el fin de estudiar si existe una relación directa entre la metilación del promotor de RP-B y su expresión en la línea U373.

XI. CONCLUSIONES

Los estudios de expresión del RP mostraron que en la línea U373, derivada de astrocitoma humano grado III, la metilación regula la expresión de RP-B a nivel del RNA mensajero y de la proteína. No obstante, la isoforma RP-A no tuvo cambios en su expresión al tratar las células con 5Aza. En la línea celular D54, la expresión de las isoformas del RP no se modifica al desmetilar el DNA, por lo que en una línea de mayor grado de evolución al parecer se pierde la regulación del RP por mecanismos de metilación.

En los ensayos de determinación del número celular, el tratamiento con P4 indujo la proliferación de las células, mientras que los tratamientos con 5Aza y P4+5Aza disminuyeron el número de células. La desmetilación con 5Aza probablemente arreste a las células en alguna fase del ciclo celular, dado que permanecen viables, pero el número de células disminuye.

XII. PERSPECTIVAS

Para continuar con el estudio de los mecanismos de regulación de la expresión del RP en astrocitomas humanos es necesario estudiar el efecto del tratamiento conjunto de 5Aza y un inhibidor de HDAC. Esto con el fin de observar si la acetilación de las histonas también está participando en la regulación de la expresión de las isoformas del RP. Asimismo, nos gustaría estudiar el contenido de las DNMT, puesto que se ha visto que los cambios en su expresión están relacionados con alteraciones en el patrón de metilación de algunos genes en cáncer. Dado que observamos cambios en la expresión del RP-B al tratar a las células con 5Aza hemos empezado a estudiar el patrón de metilación de la región promotora de RP-B con el fin de encontrar una relación directa entre los niveles de expresión del receptor y el grado de metilación del mismo.

XIII. REFERENCIAS

- Abdel-Hafiz, H., G.S. Takimoto, L. Tung, and K.B. Horwitz. 2002. The inhibitory function in human progesterone receptor N termini binds SUMO-1 protein to regulate autoinhibition and transrepression. *J Biol Chem.* 277:33950-6.
- Alcantara Llaguno, S., J. Chen, C.H. Kwon, E.L. Jackson, Y. Li, D.K. Burns, A. Alvarez-Buylla, and L.F. Parada. 2009a. Malignant astrocytomas originate from neural stem/progenitor cells in a somatic tumor suppressor mouse model. *Cancer Cell.* 15:45-56.
- Alcantara Llaguno, S.R., J. Chen, and L.F. Parada. 2009b. Signaling in malignant astrocytomas: role of neural stem cells and its therapeutic implications. *Clin Cancer Res.* 15:7124-9.
- Antequera, F. 2003. Structure, function and evolution of CpG island promoters. *Cell Mol Life Sci.* 60:1647-58.
- Assimakopoulou, M., G. Sotiropoulou-Bonikou, T. Maraziotis, and J. Varakis. 1998. Does sex steroid receptor status have any prognostic or predictive significance in brain astrocytic tumors? *Clin Neuropathol.* 17:27-34.
- Bain, D.L., M.A. Franden, J.L. McManaman, G.S. Takimoto, and K.B. Horwitz. 2001. The N-terminal region of human progesterone B-receptors: biophysical and biochemical comparison to A-receptors. *J Biol Chem.* 276:23825-31.
- Batistatou, A., D. Stefanou, A. Goussia, E. Arkoumani, A.G. Papavassiliou, and N.J. Agnantis. 2004. Estrogen receptor beta (ERbeta) is expressed in brain astrocytic tumors and declines with dedifferentiation of the neoplasm. *J Cancer Res Clin Oncol.* 130:405-10.
- Bigner, S.H., D.E. Bullard, C.N. Pegram, C.J. Wikstrand, and D.D. Bigner. 1981. Relationship of in vitro morphologic and growth characteristics of established human glioma-derived cell lines to their tumorigenicity in athymic nude mice. *J Neuropathol Exp Neurol.* 40:390-409.
- Bigner, S.H., J. Mark, and D.D. Bigner. 1990. Cytogenetics of human brain tumors. *Cancer Genet Cytogenet.* 47:141-54.
- Bolander, F.F. 2004. Molecular Endocrinology. Elsevier Academic Press, San Diego, California, USA. 632 pp.
- Bonéy-Montoya, J., Y.S. Ziegler, C.D. Curtis, J.A. Montoya, and A.M. Nardulli. 2010. Long-range transcriptional control of progesterone receptor gene expression. *Mol Endocrinol.* 24:346-58.
- Boonyaratanakornkit, V., Y. Bi, M. Rudd, and D.P. Edwards. 2008. The role and mechanism of progesterone receptor activation of extra-nuclear signaling pathways in regulating gene transcription and cell cycle progression. *Steroids.* 73:922-8.
- Boonyaratanakornkit, V., E. McGowan, L. Sherman, M.A. Mancini, B.J. Cheskis, and D.P. Edwards. 2007. The role of extranuclear signaling actions of progesterone receptor in mediating progesterone regulation of gene expression and the cell cycle. *Mol Endocrinol.* 21:359-75.
- Boonyaratanakornkit, V., M.P. Scott, V. Ribon, L. Sherman, S.M. Anderson, J.L. Maller, W.T. Miller, and D.P. Edwards. 2001. Progesterone receptor contains a proline-rich motif that directly interacts with SH3 domains and activates c-Src family tyrosine kinases. *Mol Cell.* 8:269-80.
- 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.* 29:313-39.

- Burgess, R., R. Jenkins, and Z. Zhang. 2008. Epigenetic changes in gliomas. *Cancer Biol Ther.* 7:1326-34.
- Cabrera-Muñoz, E., A. González-Arenas, M. Saqui-Salces, J. Camacho, F. Larrea, R. García-Becerra, and I. Camacho-Arroyo. 2009. Regulation of progesterone receptor isoforms content in human astrocytoma cell lines. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 113:80-4.
- Camacho-Arroyo, I. 2003. Progesterone receptor isoforms expression and progesterone actions in the brain. *Recent Research Developments in Life Sciences, Research Signpost:*221-242.
- Camacho-Arroyo, I., A. Gonzalez-Arenas, G. Gonzalez-Aguero, C. Guerra-Araiza, and G. Gonzalez-Moran. 2003. Changes in the content of progesterone receptor isoforms and estrogen receptor alpha in the chick brain during embryonic development. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 136:447-52.
- Camacho-Arroyo, I., A. González-Arenas, and G. González-Morán. 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.* 146:644-52.
- Camacho-Arroyo, I., and M. Rodríguez-Dorantes. 2006. Transcriptional activity regulated by progesterone receptor isoforms. *Molecular Endocrinology, Research Signpost:*25-38.
- Camacho-Arroyo, I., O. Villamar-Cruz, A. González-Arenas, and C. Guerra-Araiza. 2002. Participation of the 26S proteasome in the regulation of progesterone receptor concentrations in the rat brain. *Neuroendocrinology.* 76:267-271.
- Carroll, R.S., J. Zhang, K. Dashner, M. Sar, and P.M. Black. 1995. Steroid hormone receptors in astrocytic neoplasms. *Neurosurgery.* 37:496-503; discussion 503-4.
- Chai, G., L. Li, W. Zhou, L. Wu, Y. Zhao, D. Wang, S. Lu, Y. Yu, H. Wang, M.A. McNutt, Y.G. Hu, Y. Chen, Y. Yang, X. Wu, G.A. Otterson, and W.G. Zhu. 2008. HDAC inhibitors act with 5-aza-2'-deoxycytidine to inhibit cell proliferation by suppressing removal of incorporated abases in lung cancer cells. *PLoS One.* 3:e2445.
- Chen, F.P., M.H. Chien, H.Y. Chen, and Y.T. Ng. 2011. Effects of different progestogens on human breast tumor cell growth. *Climacteric.* 14:345-51.
- Christman, J.K. 2002. 5-Azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy. *Oncogene.* 21:5483-95.
- Chu, Y., X. Yue, S.T. Younger, B.A. Janowski, and D.R. Corey. 2010. Involvement of argonaute proteins in gene silencing and activation by RNAs complementary to a non-coding transcript at the progesterone receptor promoter. *Nucleic Acids Res.*
- Chung, Y.G., H.K. Kim, H.K. Lee, and K.C. Lee. 1996. Expression of androgen receptors in astrocytoma. *J Korean Med Sci.* 11:517-21.
- Conneely, O.M., B. Mulac-Jericevic, and J.P. Lydon. 2003. Progesterone-dependent regulation of female reproductive activity by two distinct progesterone receptor isoforms. *Steroids.* 68:771-8.
- Cork, D.M., T.W. Lennard, and A.J. Tyson-Capper. 2008. Alternative splicing and the progesterone receptor in breast cancer. *Breast Cancer Res.* 10:207.
- Cui, W., Q. Li, L. Feng, and W. Ding. 2011. MiR-126-3p regulates progesterone receptors and involves development and lactation of mouse mammary gland. *Mol Cell Biochem.*
- Daniel, A.R., T.P. Knutson, and C.A. Lange. 2009. Signaling inputs to progesterone receptor gene regulation and promoter selectivity. *Mol Cell Endocrinol.* 308:47-52.
- de la Fuente, B.P., J. Dalmau, and M. Rosenfeld. 2007. Glioma therapy up-date. *Neurologia.* 22:159-69.
- Dick, J.E. 2008. Stem cell concepts renew cancer research. *Blood.* 112:4793-807.

- Dietrich, J., J. Imitola, and S. Kesari. 2008. Mechanisms of Disease: the role of stem cells in the biology and treatment of gliomas. *Nat Clin Pract Oncol.* 5:393-404.
- Edwards, D.P. 2000. The role of coactivators and corepressors in the biology and mechanism of action of steroid hormone receptors. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 5:307-24.
- Ehrlich, M. 2002. DNA methylation in cancer: too much, but also too little. *Oncogene.* 21:5400-13.
- Ellmann, S., H. Sticht, F. Thiel, M.W. Beckmann, R. Strick, and P.L. Strissel. 2009. Estrogen and progesterone receptors: from molecular structures to clinical targets. *Cell Mol Life Sci.* 66:2405-26.
- Faghihi, M.A., and C. Wahlestedt. 2009. Regulatory roles of natural antisense transcripts. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 10:637-43.
- Fan, J., W.J. Yin, J.S. Lu, L. Wang, J. Wu, F.Y. Wu, G.H. Di, Z.Z. Shen, and Z.M. Shao. 2008. ER alpha negative breast cancer cells restore response to endocrine therapy by combination treatment with both HDAC inhibitor and DNMT inhibitor. *J Cancer Res Clin Oncol.* 134:883-90.
- Flötotto, 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.* 88:131-42.
- Furnari, F.B., T. Fenton, R.M. Bachoo, A. Mukasa, J.M. Stommel, A. Stegh, W.C. Hahn, K.L. Ligon, D.N. Louis, C. Brennan, L. Chin, R.A. DePinho, and W.K. Cavenee. 2007. Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. *Genes Dev.* 21:2683-710.
- Gellersen, B., M.S. Fernandes, and J.J. Brosens. 2009. Non-genomic progesterone actions in female reproduction. *Hum Reprod Update.* 15:119-38.
- Giangrande, P.H., E.A. Kimbrel, D.P. Edwards, and D.P. McDonnell. 2000. The opposing transcriptional activities of the two isoforms of the human progesterone receptor are due to differential cofactor binding. *Mol Cell Biol.* 20:3102-15.
- Godard, S., G. Getz, M. Delorenzi, P. Farmer, H. Kobayashi, I. Desbaillets, M. Nozaki, A.C. Diserens, M.F. Hamou, P.Y. Dietrich, L. Regli, R.C. Janzer, P. Bucher, R. Stupp, N. de Tribolet, E. Domany, and M.E. Hegi. 2003. Classification of human astrocytic gliomas on the basis of gene expression: a correlated group of genes with angiogenic activity emerges as a strong predictor of subtypes. *Cancer Res.* 63:6613-25.
- González-Agüero, G., A.A. Gutiérrez, D. González-Espinosa, J.D. Solano, R. Morales, A. González-Arenas, E. Cabrera-Muñoz, and I. Camacho-Arroyo. 2007. Progesterone effects on cell growth of U373 and D54 human astrocytoma cell lines. *Endocrine.* 32:129-35.
- González-Agüero, G., R. Ondarza, A. Gamboa-Domínguez, M.A. Cerbón, and I. Camacho-Arroyo. 2001. Progesterone receptor isoforms expression pattern in human astrocytomas. *Brain Res Bull.* 56:43-8.
- Gopalakrishnan, S., B.O. Van Emburgh, and K.D. Robertson. 2008. DNA methylation in development and human disease. *Mutat Res.* 647:30-8.
- Götze, S., M. Wolter, G. Reifenberger, O. Müller, and S. Sievers. 2009. Frequent promoter hypermethylation of Wnt pathway inhibitor genes in malignant astrocytic gliomas. *Int J Cancer.* 126:2584-93.
- Graham, J.D., and C.L. Clarke. 1997. Physiological action of progesterone in target tissues. *Endocr. Rev.*:502-519.

- Graham, J.D., and C.L. Clarke. 2002. Expression and transcriptional activity of progesterone receptor A and progesterone receptor B in mammalian cells. *Breast Cancer Res.* 4:187-90.
- Gronemeyer, H. 1991. Transcription activation by estrogen and progesterone receptors. *Annu Rev Genet.* 25:89-123.
- Guerra-Araiza, C., P. Gûmora-Arrati, M. Garcìa-Ju-rez, A. Armengual-Villegas, A. Miranda-Martínez, F.J. Lima-Hernández, I. Camacho-Arroyo, and O. González-Flores. 2009. Role of progesterone receptor isoforms in female sexual behavior induced by progestins in rats. *Neuroendocrinology.* 90:73-81.
- 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.* 15:984-90.
- Hagan, C.R., E.J. Faivre, and C.A. Lange. 2009. Scaffolding actions of membrane-associated progesterone receptors. *Steroids.* 74:568-72.
- Henderson, L.P. 2007. Steroid modulation of GABAA receptor-mediated transmission in the hypothalamus: effects on reproductive function. *Neuropharmacology.* 52:1439-53.
- 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.* 273:5455-60.
- Illingworth, R.S., and A.P. Bird. 2009. CpG islands--'a rough guide'. *FEBS Lett.* 583:1713-20.
- Iwase, H., Y. Omoto, H. Iwata, T. Toyama, Y. Hara, Y. Ando, Y. Ito, Y. Fujii, and S. Kobayashi. 1999. DNA methylation analysis at distal and proximal promoter regions of the oestrogen receptor gene in breast cancers. *Br J Cancer.* 80:1982-6.
- Jabbour, E., J.P. Issa, G. Garcia-Manero, and H. Kantarjian. 2008. Evolution of decitabine development: accomplishments, ongoing investigations, and future strategies. *Cancer.* 112:2341-51.
- 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.* 17:995-1005.
- 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.* 9:1603-14.
- Khalid, H., S. Shibata, M. Kishikawa, A. Yasunaga, M. Iseki, and T. Hiura. 1997. Immunohistochemical analysis of progesterone receptor and Ki-67 labeling index in astrocytic tumors. *Cancer.* 80:2133-40.
- Kim, J.K., M. Samaranayake, and S. Pradhan. 2009. Epigenetic mechanisms in mammals. *Cell Mol Life Sci.* 66:596-612.
- Kim, T.S., A.L. Halliday, E.T. Hedley-Whyte, and K. Convery. 1991. Correlates of survival and the Daumas-Duport grading system for astrocytomas. *J Neurosurg.* 74:27-37.
- Knotts, T.A., R.S. Orkiszewski, R.G. Cook, D.P. Edwards, and N.L. Weigel. 2001. Identification of a phosphorylation site in the hinge region of the human progesterone receptor and additional amino-terminal phosphorylation sites. *J Biol Chem.* 276:8475-83.
- Kraus, W.L., and B.S. Katzenellenbogen. 1993. Regulation of progesterone receptor gene expression and growth in the rat uterus: modulation of estrogen actions by progesterone and sex steroid hormone antagonists. *Endocrinology.* 132:2371-9.

- Lange, C.A., T. Shen, and K.B. Horwitz. 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.* 97:1032-7.
- Li, Q., A. Jedlicka, N. Ahuja, M.C. Gibbons, S.B. Baylin, P.C. Burger, and J.P. Issa. 1998. Concordant methylation of the ER and N33 genes in glioblastoma multiforme. *Oncogene.* 16:3197-202.
- Lishko, P.V., I.L. Botchkina, and Y. Kirichok. 2011. Progesterone activates the principal Ca²⁺ channel of human sperm. *Nature.* 471:387-91.
- Liu, Z.J., M. Maekawa, T. Horii, and M. Morita. 2003. The multiple promoter methylation profile of PR gene and ERalpha gene in tumor cell lines. *Life Sci.* 73:1963-72.
- 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.* 567:327-32.
- Louis, D.N. 2006. Molecular pathology of malignant gliomas. *Annu Rev Pathol.* 1:97-117.
- Luszczek, W., V. Cheryath, T.M. Mekhail, and E.C. Borden. 2010. Combinations of DNA methyltransferase and histone deacetylase inhibitors induce DNA damage in small cell lung cancer cells: correlation of resistance with IFN-stimulated gene expression. *Mol Cancer Ther.* 9:2309-21.
- Mani, S. 2008. Progesterone receptor subtypes in the brain: the known and the unknown. *Endocrinology.* 149:2750-6.
- Mc Cormack, O., W.Y. Chung, P. Fitzpatrick, F. Cooke, B. Flynn, M. Harrison, E. Fox, E. Gallagher, A. McGoldrick, P.A. Dervan, A. McCann, and M.J. Kerin. 2008. Progesterone receptor B (PRB) promoter hypermethylation in sporadic breast cancer: progesterone receptor B hypermethylation in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 111:45-53.
- McKenna, N.J., and B.W. O'Malley. 2002. Combinatorial control of gene expression by nuclear receptors and coregulators. *Cell.* 108:465-74.
- Molenda-Figueira, H.A., S.D. Murphy, K.L. Shea, N.K. Siegal, Y. Zhao, J.G. Chadwick, Jr., L.A. Denner, and M.J. Tetel. 2008. Steroid receptor coactivator-1 from brain physically interacts differentially with steroid receptor subtypes. *Endocrinology.* 149:5272-9.
- Momparler, R.L. 2005. Epigenetic therapy of cancer with 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine). *Semin Oncol.* 32:443-51.
- Momparler, R.L., and V. Bovenzi. 2000. DNA methylation and cancer. *J Cell Physiol.* 183:145-54.
- Nieto, M., E. Samper, M.F. Fraga, G. González de Buitrago, M. Esteller, and M. Serrano. 2004. The absence of p53 is critical for the induction of apoptosis by 5-aza-2'-deoxycytidine. *Oncogene.* 23:735-43.
- Nowell, P.C. 1976. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science.* 194:23-8.
- Nussey, S.S., and S.A. Whitehead. 2001. *Endocrinology: An Integrated Approach.* Taylor & Francis Group, London.
- O'Connell, L.A., B.J. Matthews, S.B. Patel, J.D. O'Connell, and D. Crews. 2011. Molecular characterization and brain distribution of the progesterone receptor in whiptail lizards. *Gen Comp Endocrinol.* 171:64-74.
- Ohgaki, H., and P. Kleihues. 2005. Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas. *J Neuropathol Exp Neurol.* 64:479-89.
- Petz, L.N., and A.M. Nardulli. 2000. Sp1 binding sites and an estrogen response element half-site are involved in regulation of the human progesterone receptor A promoter. *Mol Endocrinol.* 14:972-85.

- Petz, L.N., Y.S. Ziegler, M.A. Loven, and A.M. Nardulli. 2002. Estrogen receptor alpha and activating protein-1 mediate estrogen responsiveness of the progesterone receptor gene in MCF-7 breast cancer cells. *Endocrinology*. 143:4583-91.
- Petz, L.N., Y.S. Ziegler, J.R. Schultz, H. Kim, J.K. Kemper, and A.M. Nardulli. 2004a. Differential regulation of the human progesterone receptor gene through an estrogen response element half site and Sp1 sites. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 88:113-22.
- Petz, L.N., Y.S. Ziegler, J.R. Schultz, and A.M. Nardulli. 2004b. Fos and Jun inhibit estrogen-induced transcription of the human progesterone receptor gene through an activator protein-1 site. *Mol Endocrinol*. 18:521-32.
- Portela, A., and M. Esteller. 2010. Epigenetic modifications and human disease. *Nat Biotechnol*. 28:1057-68.
- Richer, J.K., B.M. Jacobsen, N.G. Manning, M.G. Abel, D.M. Wolf, and K.B. Horwitz. 2002. Differential gene regulation by the two progesterone receptor isoforms in human breast cancer cells. *J Biol Chem*. 277:5209-18.
- Rodríguez-Dorantes, M., N. Téllez-Ascencio, M.A. Cerbón, M. López, and A. Cervantes. 2004. DNA methylation: an epigenetic process of medical importance. *Rev Invest Clin*. 56:56-71.
- 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*. 8:1347-60.
- Sasaki, M., A. Dharia, B.R. Oh, Y. Tanaka, S. Fujimoto, and R. Dahiya. 2001. Progesterone receptor B gene inactivation and CpG hypermethylation in human uterine endometrial cancer. *Cancer Res*. 61:97-102.
- Sasaki, M., M. Kaneuchi, S. Fujimoto, Y. Tanaka, and R. Dahiya. 2003. Hypermethylation can selectively silence multiple promoters of steroid receptors in cancers. *Mol Cell Endocrinol*. 202:201-7.
- Sasaki, M., Y. Tanaka, G. Perinchery, A. Dharia, I. Kotcherguina, S. Fujimoto, and R. Dahiya. 2002. Methylation and inactivation of estrogen, progesterone, and androgen receptors in prostate cancer. *J Natl Cancer Inst*. 94:384-90.
- Savouret, J.F., A. Bailly, M. Misrahi, C. Rauch, G. Redeuilh, A. Chauchereau, and E. Milgrom. 1991. Characterization of the hormone responsive element involved in the regulation of the progesterone receptor gene. *EMBO J*. 10:1875-83.
- 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.
- Schaefer, M., and F. Lyko. 2010. Solving the Dnmt2 enigma. *Chromosoma*. 119:35-40.
- Schülke, J.P., G.M. Wochnik, I. Lang-Rollin, N.C. Gassen, R.T. Knapp, B. Berning, A. Yassouridis, and T. Rein. 2010. Differential impact of tetratricopeptide repeat proteins on the steroid hormone receptors. *PLoS One*. 5:e11717.
- Schultz, J.R., L.N. Petz, and A.M. Nardulli. 2003. Estrogen receptor alpha and Sp1 regulate progesterone receptor gene expression. *Mol Cell Endocrinol*. 201:165-75.
- Schultz, J.R., L.N. Petz, and A.M. Nardulli. 2005. Cell- and ligand-specific regulation of promoters containing activator protein-1 and Sp1 sites by estrogen receptors alpha and beta. *J Biol Chem*. 280:347-54.
- Schwartz, J.C., S.T. Younger, N.B. Nguyen, D.B. Hardy, B.P. Monia, D.R. Corey, and B.A. Janowski. 2008. Antisense transcripts are targets for activating small RNAs. *Nat Struct Mol Biol*. 15:842-8.
- Schwartzbaum, J.A., J.L. Fisher, K.D. Aldape, and M. Wrensch. 2006. Epidemiology and molecular pathology of glioma. *Nat Clin Pract Neurol*. 2:494-503; quiz 1 p following 516.

- Simó-Riudalbas, L., S.A. Melo, and M. Esteller. 2011. DNMT3B gene amplification predicts resistance to DNA demethylating drugs. *Genes Chromosomes Cancer*. 50:527-34.
- Stratmann, A., and B. Haendler. 2011. The histone demethylase JARID1A regulates progesterone receptor expression. *FEBS J*:1458-1469.
- Tamm, K., M. Room, A. Salumets, and M. Metsis. 2009. Genes targeted by the estrogen and progesterone receptors in the human endometrial cell lines HECIA and RL95-2. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 7.
- Tang, B., Z.H. Peng, and J. Jiang. 2005. [The synergistic inhibitory effect of 5-aza-2-deoxycytidine and Tamoxifen on estrogen receptor alpha negative breast cancer cell lines in vitro]. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi*. 43:1545-9.
- Thomas, P. 2008. Characteristics of membrane progesterin receptor alpha (mPRalpha) and progesterone membrane receptor component 1 (PGMRC1) and their roles in mediating rapid progesterin actions. *Front Neuroendocrinol*. 29:292-312.
- Tung, L., H. Abdel-Hafiz, T. Shen, D.M. Harvell, L.K. Nitao, J.K. Richer, C.A. Sartorius, G.S. Takimoto, and K.B. Horwitz. 2006. Progesterone receptors (PR)-B and -A regulate transcription by different mechanisms: AF-3 exerts regulatory control over coactivator binding to PR-B. *Mol Endocrinol*. 20:2656-70.
- Turgeon, J.L., and D.W. Waring. 2000. Progesterone regulation of the progesterone receptor in rat gonadotropes. *Endocrinology*. 141:3422-9.
- Villamar-Cruz, O., J. Manjarrez-Marmolejo, R. Alvarado, and I. Camacho-Arroyo. 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.
- Waha, A., J. Felsberg, W. Hartmann, A. von dem Knesebeck, T. Mikeska, S. Joos, M. Wolter, A. Koch, P.S. Yan, E. Endl, O.D. Wiestler, G. Reifenberger, and T. Pietsch. 2010. Epigenetic downregulation of mitogen-activated protein kinase phosphatase MKP-2 relieves its growth suppressive activity in glioma cells. *Cancer Res*. 70:1689-99.
- Ward, R.D., and N.L. Weigel. 2009. Steroid receptor phosphorylation: Assigning function to site-specific phosphorylation. *Biofactors*. 35:528-36.
- Wargon, V., S.V. Fernandez, M. Goin, S. Giulianelli, J. Russo, and C. Lanari. 2010. Hypermethylation of the progesterone receptor A in constitutive antiprogesterin-resistant mouse mammary carcinomas. *Breast Cancer Res Treat*.
- Watts, J.K., D. Yu, K. Charisse, C. Montallier, P. Potier, M. Manoharan, and D.R. Corey. 2010. Effect of chemical modifications on modulation of gene expression by duplex antigene RNAs that are complementary to non-coding transcripts at gene promoters. *Nucleic Acids Res*. 38:5242-59.
- Wikstrand, C.J., H.S. Bigner, and D.D. Bigner. 1983. Demonstration of Complex Antigenic Heterogeneity in a Human Glioma Cell Line and Eight Derived Clones by Specific Monoclonal Antibodies. *Cancer Research*. 43:3327-3334.
- Wilson, M.E., and J.M. Westberry. 2009. Regulation of oestrogen receptor gene expression: new insights and novel mechanisms. *J Neuroendocrinol*. 21:238-42.
- Wilson, M.E., J.M. Westberry, and A.K. Prewitt. 2008. Dynamic regulation of estrogen receptor-alpha gene expression in the brain: a role for promoter methylation? *Front Neuroendocrinol*. 29:375-85.
- Xie, Z. 2009. Brain tumor stem cells. *Neurochem Res*. 34:2055-66.
- Xiong, Y., S.C. Dowdy, J. Gonzalez Bosquet, Y. Zhao, N.L. Eberhardt, K.C. Podratz, and S.W. Jiang. 2005. Epigenetic-mediated upregulation of progesterone receptor B gene in endometrial cancer cell lines. *Gynecol Oncol*. 99:135-41.
- Xu, X., F.E. Murdoch, E.M. Curran, W.V. Welshons, and M.K. Fritsch. 2004. Transcription factor accessibility and histone acetylation of the progesterone receptor gene differs

- between parental MCF-7 cells and a subline that has lost progesterone receptor expression. *Gene*. 328:143-51.
- Yang, C., L. Chen, C. Li, M.C. Lynch, C. Brisken, and E.V. Schmidt. 2010. Cyclin D1 enhances the response to estrogen and progesterone by regulating progesterone receptor expression. *Mol Cell Biol*. 30:3111-25.
- Yang, X., D.L. Phillips, A.T. Ferguson, W.G. Nelson, J.G. Herman, and N.E. Davidson. 2001. Synergistic activation of functional estrogen receptor (ER)-alpha by DNA methyltransferase and histone deacetylase inhibition in human ER-alpha-negative breast cancer cells. *Cancer Res*. 61:7025-9.
- Yin, D., J.M. Ong, J. Hu, J.C. Desmond, N. Kawamata, B.M. Konda, K.L. Black, and H.P. Koeffler. 2007. Suberoylanilide hydroxamic acid, a histone deacetylase inhibitor: effects on gene expression and growth of glioma cells in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res*. 13:1045-52.
- Yu, J., H. Zhang, J. Gu, S. Lin, J. Li, W. Lu, Y. Wang, and J. Zhu. 2004. Methylation profiles of thirty four promoter-CpG islands and concordant methylation behaviours of sixteen genes that may contribute to carcinogenesis of astrocytoma. *BMC Cancer*. 4:65.
- Yu, S., M. Lee, S. Shin, and J. Park. 2001. Apoptosis induced by progesterone in human ovarian cancer cell line SNU-840. *J Cell Biochem*. 82:445-51.
- Zhang, Z., D. Li, M. Wu, B. Xiang, L. Wang, M. Zhou, P. Chen, X. Li, S. Shen, and G. Li. 2008. Promoter hypermethylation-mediated inactivation of LRRC4 in gliomas. *BMC Mol Biol*. 9:99.
- Zhu, W.G., T. Hileman, Y. Ke, P. Wang, S. Lu, W. Duan, Z. Dai, T. Tong, M.A. Villalona-Calero, C. Plass, and G.A. Otterson. 2004. 5-aza-2'-deoxycytidine activates the p53/p21Waf1/Cip1 pathway to inhibit cell proliferation. *J Biol Chem*. 279:15161-6.
- Zhu, W.G., and G.A. Otterson. 2003. The interaction of histone deacetylase inhibitors and DNA methyltransferase inhibitors in the treatment of human cancer cells. *Curr Med Chem Anticancer Agents*. 3:187-99.

XIV. ANEXO

Chapter 6

Role of Progesterone Receptor Isoforms in Human Astrocytomas Growth

Ignacio Camacho-Arroyo, Valeria Hansberg-Pastor, Edith Cabrera-Muñoz, Olivia Tania Hernández-Hernández, and Aliesha González-Arenas

Abstract Progesterone (P) regulates several functions in cells through the interaction with its intracellular receptor (PR), which is a ligand-activated transcription factor that modifies the expression of genes involved in the control of cell growth and proliferation, such as vascular endothelial growth factor and epidermal growth factor receptor. Two PR isoforms have been reported: PR-B and PR-A, encoded by the same gene but with different function and regulation. It has been shown that PR isoforms are expressed in U373 and D54 cell lines, which are derived from grades III and IV of human astrocytomas, respectively. Our group has recently reported that P increases cell growth in both cells lines. The PR antagonist, RU486, blocked P effects and its treatment alone significantly reduced human astrocytomas cell growth in vitro. The over-expression of PR-A in U373 cells significantly reduced P effects. These data suggest that P regulates human astrocytomas cell growth through the interaction with PR and that PR-B/PR-A expression ratio is determinant in P functions in astrocytomas.

Keywords Progesterone · Brain tumor · Glioma · PR isoforms · Ubiquitin–proteasome system

Introduction

Progesterone (P) participates in the regulation of several physiological and pathological processes in the brain of mammals. This hormone has been involved in the growth of brain tumors such as chordomas, meningiomas and astrocytomas. The latter are the most frequent primary brain tumors and constitute a leading cause of cancer related deaths.

P mainly elicits its effects by interaction with its intracellular receptor (PR), which is a ligand-activated transcription factor. Two isoforms of PR, PR-A and PR-B, differentially regulate gene transcription, recognize different promoters and present distinct functions. PR activity is fundamental in development, growth and proliferation of tumors. In this chapter we present an overview of the research about the role of P and PR isoforms in cell growth of human astrocytomas.

Astrocytomas

Astrocytomas arise from astrocytes and are the most common primary intracerebral neoplasms in humans. Astrocytic tumors constitute 65–70% of all gliomas, and four malignancy grades are recognized by the World Health Organisation (WHO). As described by Rousseau et al. (2008), Grade I applies to lesions with low proliferative potential, minimal variation in shape and size of nuclei and the possibility of cure following surgical resection. Grade II tumors are generally infiltrative, present low proliferative activity, nuclear atypia and some grade II tumors tend to progress to higher grades of malignancy. The designation of grade III tumor is generally reserved for lesions with

I. Camacho-Arroyo (✉)
Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Coyoacán, México 04510, D.F. México
e-mail: camachoarroyo@gmail.com

50 histological evidence of malignancy, including nuclear
51 atypia and brisk mitotic activity, patients with grade III
52 tumors receive adjuvant radiation and/or chemother-
53 apy. Grade IV tumors exhibit more advanced fea-
54 tures of malignancy, including vascular proliferation,
55 mitoses and necrosis, typically associated with rapid
56 pre- and postoperative disease evolution and a fatal
57 outcome.

58 Hulleman and Helin (2005), mentioned that average
59 survival of patients with astrocytomas grade I could
60 be long after surgery and treatment, while grade II is
61 around 7 years and patients with astrocytomas grade III
62 have a median survival half that time, around 3.5 years.
63 Astrocytomas grade IV (glioblastomas) patients have
64 a very poor prognosis with average survival reported
65 between 9 and 11 months. Ichimura et al. (2004), clas-
66 sified the glioblastomas into those that develop from
67 a previously diagnosed astrocytoma and those that
68 appear to develop de novo. The treatment given to
69 patients with astrocytomas depends on many factors,
70 including the tumor size and localization, its growth
71 rate, and the symptoms the patient is experiencing.
72 Various strategies have been used to treat astrocytomas
73 including extensive surgical resection, fractionated and
74 focused radiation and intracavitary and/or intra-arterial
75 chemotherapy that result in prolonged and non-always
76 significant survival for patients and compromise brain
77 function. An alternative treatment for astrocytomas
78 is hormonal therapy based on sex steroid hormones
79 such as P, which participates in the regulation of cell
80 proliferation of several tumors such as breast cancer
81 and meningiomas (intracranial or intraspinal from the
82 arachnoidal layer of meninges).

85 **Genomic Mechanism of Action** 86 **of Progesterone (P)**

87
88
89 Many P actions are mediated by PR which is a
90 ligand-activated transcription factor that regulates the
91 expression of several genes involved in metabolism,
92 development and reproduction as well as cell cycle
93 progression.

AQ3, 94 Camacho-Arroyo (2003), mentioned that the
95 genomic mechanism of action involves the interaction
96 of P with PR, located in cytoplasm or nucleus. In
97 absence of ligand PR is associated with heat shock
98 proteins (HSP70 and HSP90). When the hormone

interacts with PR, it induces conformational changes
that allow the dissociation with heat shock proteins,
followed by phosphorylation and dimerization of
the receptor. The resulting structure possesses high
affinity for specific sequences in the DNA, known
as P response elements (PRE) which are present in
the promoter region of P target genes. Once bound to
PRE, PR is able to recruit coregulators proteins (coac-
tivators or corepressors) regulating gene transcription
(Fig. 6.1). Nuclear receptors coregulators are required
by the receptors for efficient transcriptional regulation.
Coactivators interact with nuclear receptors in a
ligand-dependent manner and enhance their transcrip-
tional activity, whereas, corepressors interact with
nuclear receptors, either in the absence of hormone
or in the presence of antagonists and diminish the
transcription rate of their target genes.

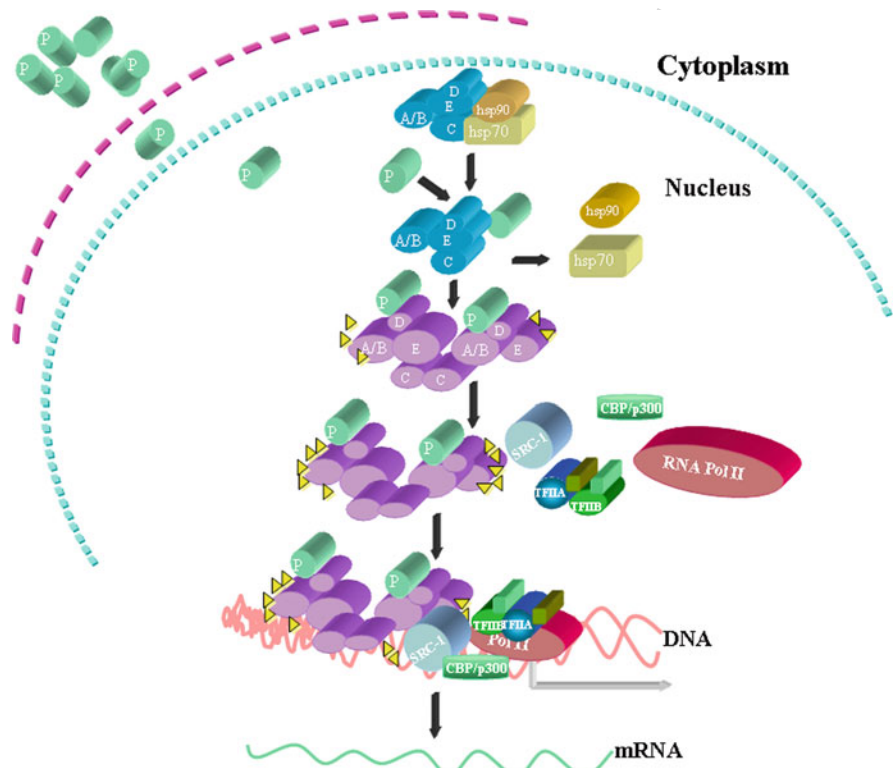
Rosenfeld et al. (2006), have reported that the
steroid receptor coactivator (SRC) family is a well-
studied group of coregulator proteins that have histone
acetyltransferase (HAT) activity. Some of the best-
characterized nuclear receptor coactivators belong to
the SRC-family. McKenna et al. (1999), mentioned
that the members of SRC family interact with steroid
receptors including PR, and enhance their transcrip-
tional activation in a ligand-dependent manner. Lange
et al. (2000) and Camacho-Arroyo et al. (2002),
observed that P induces PR phosphorylation, which
signals it to degradation by the ubiquitin-proteasome
system.

Transcriptional Activity of PR Isoforms

Kastner et al. (1990), have reported two main PR iso-
forms in humans: a full-length form (PR-B, 114 kDa)
and an N-terminal truncated one (PR-A, 94 kDa).
PR isoforms are encoded by the same gene, but
their expression is regulated by distinct promoters.
Leonhardt et al. (2003), have seen in general that PR-B
is a much stronger transcriptional activator than PR-A
and the latter exhibits a dominant negative inhibitory
effect on the activity of PR-B. Richer et al. (2002),
observed in human breast cancer cells that PR-A and
PR-B are functionally unique transcriptional factors
that differentially regulate gene transcription within the
same promoter context, and are capable of recognizing
different promoters.

6 Role of Progesterone Receptor Isoforms in Human Astrocytomas Growth

Fig. 6.1 Genomic mechanism of P action. In the unligated form, PR is associated with chaperone proteins such as heat shock proteins HSP70 and HSP90. After P cell entrance and binding, PR dissociates from chaperone proteins and dimerizes with another PR. Then, PR is phosphorylated (yellow triangles) and forms a complex with coregulators such as the coactivator protein SRC-1. PR interacts with progesterone responsive elements (PRE) in the promoter region of steroid target genes, the basal transcription machinery is recruited and the gene is transcribed. P, progesterone; A/B, C, D and E are PR domains, TIFIIA/B, transcription initiation factors, CBP/p300, histone acetyltransferase



Richer et al. (2002), reported that in human breast cancer cells of 94 genes regulated by P: 65 were uniquely regulated by PR-B, 4 uniquely by PR-A, and only 25 by both PR isoforms, e.g. genes involved in cell cycle and apoptosis such as *BIRC3* or *PCNA* were up regulated by PR-B meanwhile *Bcl-X* was up-regulated by PR-A. *TCF8* and *DSIPI* transcription factors are up regulated by PR-B and PR-A respectively. Mulac-Jericevic et al. (2000), demonstrated that PR-B is required for normal mammary gland development, while PR-A is essential for uterine development and reproductive function. Mulac-Jericevic et al. (2000), found that P up-regulation of calcitonin and amphiregulin genes depends on PR-A. All these studies suggest that each PR isoform has a different transcriptional function that regulates different cell processes.

Regulation of PR Isoforms Expression

The human PR gene is located in chromosome 11 (11q22-q23) and consists of eight exons of variable sizes separated by seven introns. Kastner et al. (1990),

identified two distinct promoters and two translational start sites that produce the two PR isoforms, A and B. Promoter A (+464 to +1105) has three putative transcription start sites (+751, +761 and +842) and a translational start site ATG1 at +1236. Promoter B (-711 to +31) has two transcription start sites at +1 and +15 and a translational start site ATG2 at +744.

It is known that PR isoforms are differentially regulated by E and P in different cells and tissues. Guerra-Araiza et al. (2003), mentioned that in several cell types PR isoforms are up-regulated by E. According to Kraus et al. (1994), PR up-regulation by E is mediated by estrogen-responsive elements located in the PR promoter whereas PR downregulation by its own ligand (P) is associated with ligand-dependent proteolysis; Camacho-Arroyo et al. (2002) and Lange et al. (2000), informed that P induces receptor phosphorylation, which signals PR to degradation by the ubiquitin-proteasome pathway.

Estrogens effects are mediated through its interaction with two intracellular receptors (ERs), ER α and ER β . Although the classical model of estrogen action has proposed that ER induces gene expression by binding first to the ligand and then to the estrogen

response element (ERE) in DNA, neither of the PR promoters contains a consensus palindromic ERE, however, any of ERs can bind to these promoters. Ellmann et al. (2009), reviewed that estrogen responsiveness can also be mediated by the interaction of ER with DNA-bound transcription factors such as AP-1 and Sp1 proteins.

Numerous transcription factor binding sites can be far apart from the proximal promoter and still play a role in regulating gene expression. Recently, Bonéy-Montoya et al. (2010), identified eight regions associated with ER α , located 48–311 kb upstream of the PR-B transcription start site which possesses one or more EREs and each of them comprise one consensus ERE half-site.

DNA methylation regulates gene transcription by modulating chromatin conformation. Momparler and Bovenzi (2000), found that hypermethylated DNA in promoter regions of many genes is usually associated with downregulated or silenced gene expression. Works from Liu et al. (2003), assumed that in many cancer cell lines one or both PR isoforms are silenced by methylation.

Role of P in Astrocytomas Proliferation

Sager et al. (2003), account for many reports about proliferative and anti-proliferative effects of P in different types of cancer. In brain tumors P has different effects. Olson et al. (1986), described that in cell cultures of meningiomas different doses of P (1–100 nM) stimulate cell growth, but in prolactinomas, Piroli et al. (1998), observed that P inhibits cell growth.

Pinski et al. (1993), published that a high dose of the PR antagonist RU486 (0.5 mg/day, during 4 days) was more effective to reduce the tumor volume as compared with the lower dose (0.1 mg/day) in nude mice bearing xenografts of the human malignant glioma U87MG. In contrast, Altinoz et al. (2001), reported that the progestin medroxyprogesterone (6 μ M), inhibits S-phase of C6 rat glioma cells by 41 and 73% at 48 and 96 h, respectively.

However, P effects on human astrocytomas growth have not been completely characterized, Gonzalez-Aguero et al. (2007), have observed that P induces cell proliferation in U373 and D54 cell lines derived from human astrocytomas grades III and IV, respectively. In

a time-course study over a 5-day period with different doses of P (1 nM to 10 μ M). In both cell lines P (10 nM) induced an increase in cell growth from the second day of culture in D54 cells and from the third day in the case of U373 cells. In both cell lines P (10 nM) effect persisted until day 5. It is important to mention that the concentration of P that induces a significant increase in the number of astrocytoma cells is found by Stening et al. (2007), in the luteal phase of the woman menstrual cycle. The treatment with the PR antagonist, RU486 (10 μ M) without P for 5 days significantly decreased the number of U373 and D54 cells as compared with vehicle treatment from the second day of the experiment. RU486 co-administered with P significantly blocked the effects of the latter on days 2 and 4 in D54 and U373 cells, respectively, suggesting that PR is involved in P regulation of astrocytomas growth.

Hernandez-Hernandez et al. (2010), determined SRC-1 and SRC-3 expression regulation by P in U373 and D54 cell lines. In D54 cell line SRC-1 mRNA expression and protein content were induced by P. SRC-3 expression was not modified by P in any cell line.

Recently, we determined the effect of P over the mRNA expression and protein content of three different molecules involved in cell proliferation and metastasis: epidermic growth factor receptor (EGFR), vascular endothelial growth factor (VEGF) and cyclin D1. We found that P did not regulate mRNA expression of EGFR or VEGF in U373 cells. However, in D54 cells this hormone increased EGFR and VEGF mRNA expression and protein content; this effect was blocked by RU486. Cyclin D1 mRNA was up-regulated by P in U373 cells and the effect was also blocked by RU486. Our data suggest that P effects on EGFR, VEGF and cyclin D1 expression are mediated by its PR.

PR Isoforms Regulation and Function in Astrocytomas

Khalid et al. (1997), found that PR expression assessed by immunohistochemistry directly correlates with histologic grades of human astrocytomas. The percentage of PR expressing in cells high-grade astrocytic tumor biopsies was higher than that of low-grade ones, suggesting that PR-positive tumors possess a high proliferative potential. Carroll et al. (1995), and

6 Role of Progesterone Receptor Isoforms in Human Astrocytomas Growth

Assimakopoulou et al. (1998), detected a strong PR nuclear immunopositivity in glioblastomas of higher malignancy compared with anaplastic astrocytomas and lower grade ones.

Gonzalez-Aguero et al. (2001), have observed that PR gene was expressed in 83 and 100% of biopsies from human astrocytomas grades III and IV, respectively. At mRNA level, PR-B expression was higher than of PR-A in human astrocytomas grades III and IV. PR immunostaining was detected in 85% of astrocytomas (grades III and IV) and, as in the case of mRNA level, PR-B isoform was the predominant one in most tumors (73%).

Gonzalez-Aguero et al. (2007), have detected PR isoforms in U373 and D54 human astrocytoma cell lines. In U373 cell line PR-B was the predominant isoform (PR-B:PR-A ratio 3:1) whereas in D54 cells PR-A was the predominant one (PR-B:PR-A ratio 0.66:1). As Richer et al. (2002), reported, PR isoforms rate is important because P can exert different functions in a cell, depending on the expression pattern of its isoforms. In the mammary gland of PR-A knockout mice (PR-A KO) Mulac-Jericevic et al. (2000), observed a lower expression of lactoferrin as compared with PR KO after treatment with estradiol (E) and P, and the contrary effect was observed for

calcitonin and histidine carboxylase expression. Thus, this differential PR isoform expression should be involved in P effects in U373 and D54 cell growth.

In U373 and D54 astrocytoma cell lines Cabrera-Munoz et al. (2009), found that PR isoforms are regulated by E (10 nM) and P (10 nM). In U373 cells PR isoforms content was increased by E, whereas in D54 cells E had no significant effects. In both cell lines P alone did not modify PR isoforms content but this was down-regulated when P was administered after E treatment. PR-A isoform was more sensitive to E + P treatment than PR-B since a greater diminution was observed in PR-A content after the combined treatment, and PR down-regulation was blocked with PR antagonist, RU 486, in U373 and D54 cells.

Cabrera-Munoz et al. (2009), have evaluated the effects of PR-A over-expression on cell growth of U373 cells (which endogenously express a low amount of PR-A) and observed an increase of 60% in PR-A content in transfected U373 cells. In a time-course study over a 6-day period PR-A over-expression significantly diminished the cell number of U373 cells treated with P (from day 4 to day 6), suggesting that PR-A has an inhibitory effect on cell growth when it is activated by its ligand (Fig. 6.2).

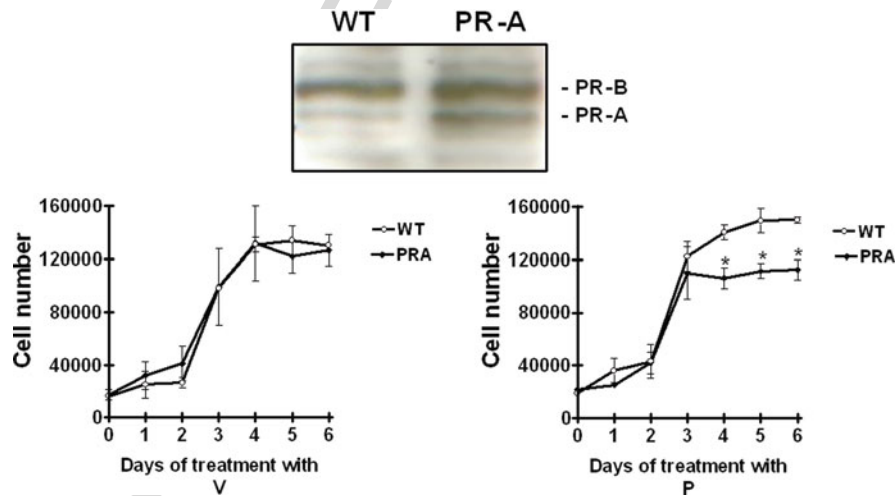


Fig. 6.2 Effects of PR-A transfection on U373 human astrocytoma cell growth. *Upper panel*, U373 wild type (WT) and U373 cells transfected with PR-A (PR-A) were lysed, proteins (70 μg) were separated by electrophoresis, and gels were electrotransferred for Western blot detection of both PR isoforms (PR-A and PR-B). *Lower panel*, U373 cells WT (○) or transfected with PR-A (◆) were treated with hormone vehicle (0.02%

cyclodextrin) (*left*) or with 10 nM of P (*right*) (day 0). Each experiment was performed in three independent cultures, each one by duplicate, during 6 days. Every day cells were removed from incubation and the number of cells was measured by trypan blue dye exclusion. Data are mean ± E.S. **p* < 0.05 vs. wild type. Published with permission of Elsevier, licence number: 2394291286863

Conclusion and Perspectives

Astrocytomas are the most frequent primary brain tumors and constitute a leading cause of cancer related deaths. An alternative treatment for astrocytomas is hormonal therapy based on sex steroid hormones such as P that increases cell proliferation in U373 and D54 human astrocytoma cell lines by interacting with PR. The expression of PR isoforms (PR-A and PR-B) directly correlates with malignancy grades of human astrocytomas, being PR-B the predominant isoform in high-grade tumors.

The increase in astrocytoma cells growth in vitro by P should involve changes in the expression of several factors participating in the control of angiogenesis, growth and proliferation, processes altered in cancer. The overexpression of PR-A decreases astrocytoma grade IV cell growth in vitro when it is activated by its ligand, suggesting that PR-A/PR-B ratio is determinant in P effects on human astrocytomas growth.

Phosphorylation increases transcriptional activity of PR and also induces its degradation by the ubiquitin-proteasome pathway; therefore a basic aspect in the study of PR isoforms function in human astrocytomas is its regulation by phosphorylation and the kinases involved in this event.

Transcriptional regulation of the PR gene requires the combined participation of various *cis* and *trans*-elements. The study of PR expression has demonstrated that methylation of one or both of its promoter regions plays an important role in cancer. Therefore, studying the methylation pattern of the PR promoter region in astrocytomas is important to understand the relation between PR content and tumor progression.

Another key aspect is the analysis of genes regulated by P in these brain tumors which would give relevant information about molecules involved in proliferation or metastasis in human astrocytomas.

References

Altinoz MA, Bilir A, Ozar E, Onar FD, Sav A (2001) Medroxyprogesterone acetate alone or synergistic with chemotherapy suppresses colony formation and DNA synthesis in C6 glioma in vitro. *Int J Dev Neurosci* 19:541–547

Assimakopoulou M, Sotiropoulou-Bonikou G, Maraziotis T, Varakis J (1998) Does sex steroid receptor status have any prognostic or predictive significance in brain astrocytic tumors? *Clin Neuropathol* 17:27–34

Bonéy-Montoya J, Ziegler YS, Curtis CD, Montoya JA, Nardulli AM (2010) Long-range transcriptional control of progesterone receptor gene expression. *Mol Endocrinol* 24:346–358

Cabrera-Munoz E, Gonzalez-Arenas A, Saqui-Salces M, Camacho J, Larrea F, Garcia-Becerra R, Camacho-Arroyo I (2009) Regulation of progesterone receptor isoforms content in human astrocytoma cell lines. *J Steroid Biochem Mol Biol* 113:80–84

Camacho-Arroyo I (2003) Progesterone receptor isoforms expression and progesterone actions in the brain in life sciences. In: Pandalai SG (ed) *Research Signpost, Kerala, India*, 221–242

Camacho-Arroyo I, Villamar-Cruz O, Gonzalez-Arenas A, Guerra-Araiza C (2002) Participation of the 26S proteasome in the regulation of progesterone receptor concentrations in the rat brain. *Neuroendocrinology* 76:267–271

Carroll RS, Zhang J, Dashner K, Sar M, Black PM (1995) Steroid hormone receptors in astrocytic neoplasms. *Neurosurgery* 37:496–503

Ellmann S, Sticht H, Thiel F, Beckmann MW, Strick R, Strissel PL (2009) Estrogen and progesterone receptors: from molecular structures to clinical targets. *Cell Mol Life Sci* 66:2405–2426

Gonzalez-Aguero G, Gutierrez AA, Gonzalez-Espinosa D, Solano JD, Morales R, Gonzalez-Arenas A, Cabrera-Munoz E, Camacho-Arroyo I (2007) Progesterone effects on cell growth of U373 and D54 human astrocytoma cell lines. *Endocrine* 32:129–135

Gonzalez-Aguero G, Ondarza R, Gamboa-Dominguez A, Cerbon MA, Camacho-Arroyo I (2001) Progesterone receptor isoforms expression pattern in human astrocytomas. *Brain Res Bull* 56:43–48

Guerra-Araiza C, Villamar-Cruz O, Gonzalez-Arenas A, Chavira R, Camacho-Arroyo I (2003) Changes in progesterone receptor isoforms content in the rat brain during the oestrous cycle and after oestradiol and progesterone treatments. *J Neuroendocrinol* 15:984–990

Hernandez-Hernandez T, Rodriguez-Dorantes M, Gonzalez-Arenas A, Camacho-Arroyo I (2010) Progesterone and estradiol effects on SRC-1 and SRC-3 expression in human astrocytoma cell lines. *Endocrine* 37:194–200

Hulleman E, Helin K (2005) Molecular mechanisms in gliomagenesis. *Adv Cancer Res* 94:1–27

Ichimura K, Ohgaki H, Kleihues P, Collins VP (2004) Molecular pathogenesis of astrocytic tumours. *J Neurooncol* 70:137–160

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

Khalid H, Shibata S, Kishikawa 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

Kraus WL, Montano MM, Katzenellenbogen BS (1994) Identification of multiple, widely spaced estrogen-responsive regions in the rat progesterone receptor gene. *Mol Endocrinol* 8:952–969

6 Role of Progesterone Receptor Isoforms in Human Astrocytomas Growth

- 295 Lange CA, Shen T, Horwitz KB (2000) Phosphorylation of
296 human progesterone receptors at serine-294 by mitogen-
297 activated protein kinase signals their degradation by the 26S
298 proteasome. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:1032–1037
- 299 Leonhardt SA, Boonyaratanakornkit V, Edwards DP (2003)
300 Progesterone receptor transcription and non-transcription
301 signaling mechanisms. *Steroids* 68:761–770
- 302 Liu ZJ, Maekawa M, Horii T, Morita M (2003) The multiple
303 promoter methylation profile of PR gene and ER alpha gene
304 in tumor cell lines. *Life Sci* 73:1963–1972
- 305 McKenna NJ, Lanz RB, O'Malley BW (1999) Nuclear recep-
306 tor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocr Rev*
20:321–344
- 307 Momparler RL, Bovenzi V (2000) DNA methylation and cancer.
308 *J Cell Physiol* 183:145–154
- 309 Mulac-Jericevic B, Mullinax RA, DeMayo FJ, Lydon JP,
310 Conneely OM (2000) Subgroup of reproductive functions of
311 progesterone mediated by progesterone receptor-B isoform.
312 *Science* 289:1751–1754
- 313 Olson JJ, Beck DW, Schlechte J, Loh PM (1986) Hormonal
314 manipulation of meningiomas in vitro. *J Neurosurg* 65:
315 99–107
- 316 Pinski J, Halmos G, Shirahige Y, Wittliff JL, Schally AV (1993)
317 Inhibition of growth of the human malignant glioma cell line
318 (U87MG) by the steroid hormone antagonist RU486. *J Clin*
319 *Endocrinol Metab* 77:1388–1392
- 320 Piroli G, Torres A, Grillo C, Lux-Lantos V, Aoki A, De Nicola
321 AF (1998) Mechanisms in progestin antagonism of pituitary
322 tumorigenesis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 64:59–67
- 323 Richer JK, Jacobsen BM, Manning NG, Abel MG, Wolf DM,
324 Horwitz KB (2002) Differential gene regulation by the two
325 progesterone receptor isoforms in human breast cancer cells.
326 *J Biol Chem* 277:5209–5218
- 327 Rosenfeld MG, Lunyak VV, Glass CK (2006) Sensors and sig-
328 nals: a coactivator/corepressor/epigenetic code for integrat-
329 ing signal-dependent programs of transcriptional response.
330 *Genes Dev* 20:1405–1428
- 331 Rousseau A, Mokhtari K, Duyckaerts C (2008) The 2007 WHO
332 classification of tumors of the central nervous system – what
333 has changed? *Curr Opin Neurol* 21:720–727
- 334 Sager G, Orbo A, Jaeger R, Engstrom C (2003) Non-genomic
335 effects of progestins–inhibition of cell growth and increased
336 intracellular levels of cyclic nucleotides. *J Steroid Biochem*
337 *Mol Biol* 84:1–8
- 338 Stening K, Eriksson O, Wahren L, Berg G, Hammar M,
339 Blomqvist A (2007) Pain sensations to the cold pressor
340 test in normally menstruating women: comparison with
341 men and relation to menstrual phase and serum sex steroid
342 levels. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 293:
343 R1711–R1716