



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**PAPEL DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN C/EBP β EN LA
REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL GEN DEL RECEPTOR A
PROGESTERONA EN ASTROCITOMAS HUMANOS**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

Valeria Hansberg Pastor

Dr. Ignacio Camacho Arroyo
Facultad de Química, UNAM

Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova
Facultad de Química, UNAM

Dr. Ángel A. Zarain Herzberg
Facultad de Medicina , UNAM

Ciudad Universitaria, Cd. Mx., Diciembre 2016



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.

Hansberg Pastor Valeria
Estudiante de Doctorado en Ciencias Bioquímicas
P r e s e n t e

Los miembros del Subcomité Académico en reunión ordinaria del día 17 de octubre del presente año, conocieron su solicitud de asignación de **JURADO DE EXAMEN** para optar por el grado de **DOCTORADO EN CIENCIAS**, con la réplica de la tesis "**Papel del factor de transcripción C/EBP β en la regulación de la expresión del gen del receptor a progesterona en astrocitomas humanos**", dirigida por el/la Dr(a) **Camacho Arroyo Ignacio**.

De su análisis se acordó nombrar el siguiente jurado integrado por los doctores:

PRESIDENTE	Canizales Quintero Samuel
VOCAL	Soto Reyes Solís Ernesto
VOCAL	Morimoto Martínez Lidya Sumiko
VOCAL	Furlan Magaril Mayra
SECRETARIO	Fernández Mejía María Cristina

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

Atentamente
"Por mi raza hablará el espíritu"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 17 de octubre de 2016
COORDINADOR


Dr. ROBERTO CORIA ORTEGA

Agradecimientos

Esta tesis se realizó bajo la dirección del Dr. Ignacio Camacho Arroyo en la Unidad de Investigación en Reproducción Humana, Instituto Nacional de Perinatología-Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y en el Departamento de Biología de la Facultad de Química, UNAM.

A la Dra. Aliesha A. González Arenas del Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM por su apoyo técnico durante el desarrollo de este trabajo.

Al comité tutorial formado por la Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova y el Dr. Ángel A. Zarain Herzberg quienes asesoraron el desarrollo de este trabajo.

Al Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas de la UNAM por brindar el apoyo académico-administrativo para realizar este trabajo.

Al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) por el apoyo económico otorgado para participar en un congreso nacional y en uno internacional.

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la DGAPA, UNAM (IN201414), y al Programa de Apoyo a la Investigación y al Posgrado (PAIP, 5000-9107) de la Facultad de Química, UNAM, por el financiamiento otorgado para el desarrollo de este trabajo.

A los miembros del jurado conformado por:

Dr. Samuel Canizales Quinteros

Dr. Ernesto Soto Reyes Solís

Dra. Lydia Sumiko Morimoto Martínez

Dra. Mayra Furlan Magaril

Dra. María Cristina Fernández Mejía

Por sus valiosos comentarios a este trabajo.

Índice

Resumen	1
Abstract	3
I. Introducción	4
II. Antecedentes	4
2.1. Tumores primarios del sistema nervioso central.....	4
2.1.1. <i>Características generales de los astrocitomas</i>	5
2.2. La progesterona y su receptor (RP) en astrocitomas de alto grado de malignidad.....	9
2.3. Estructura y función del RP.....	11
2.3.1. <i>Estructura proteínica del RP</i>	12
2.3.2. <i>Mecanismos de acción</i>	14
2.3.3. <i>Isoformas del RP</i>	17
2.4. Regulación de la expresión del gen del RP.....	20
2.4.1. <i>Regulación epigenética</i>	21
2.4.2. <i>Regulación de la expresión del RP mediada por estrógenos</i>	23
2.5. Factores de transcripción de la familia de proteínas de unión al enhancer CCAAT (C/EBP).....	27
2.5.1. <i>Estructura y función de C/EBPβ</i>	28
2.5.2. <i>C/EBPβ en el SNC</i>	31
2.5.3. <i>C/EBPβ y receptores a hormonas esteroideas</i>	34
III. Planteamiento del problema	37
IV. Hipótesis	37
V. Objetivos	38
VI. Metodología	39
6.1. Análisis <i>in silico</i>	39
6.2. Cultivo de líneas celulares y tratamientos hormonales.....	39
6.3. Extracción de proteínas y Western Blot	40

6.4. Extracción de RNA y RT-qPCR.....	41
6.5. Inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP).....	43
6.6. Producción de plásmido lentiviral e infección de células.....	44
6.7. Inmunofluorescencia.....	46
6.8. Análisis estadístico.....	47
VII. Resultados.....	47
7.1. El promotor de RP-B tiene tres potenciales sitios de unión para C/EBP.....	47
7.2. Las isoformas del RP y C/EBP β se encuentran diferencialmente expresadas en líneas celulares de glioblastoma.....	50
7.3. C/EBP β , Sp1 y RE α se unen al promotor de RP-B.....	52
7.4. C/EBP β regula negativamente la expresión de RP-B en las células U251.....	54
7.5. La regulación negativa de la expresión de RP-B mediada por C/EBP β es modulada por E2.....	58
7.6. La progesterona regula genes blanco en células con C/EBP β silenciado.....	60
VIII. Discusión.....	61
IX. Conclusiones.....	68
X. Perspectivas.....	69
XI. Referencias.....	70
XII. Anexos.....	85
12.1. Artículos en revistas indizadas.....	86
• Hansberg-Pastor V, González-Arenas A, Camacho-Arroyo I. CCAAT/Enhancer binding protein β negatively regulates progesterone receptor expression in human glioblastoma cells. <i>Molecular and Cellular Endocrinology</i> . 2017, 439:317-327.	
• Hansberg-Pastor V, Piña-Medina AG, González-Arenas A, Camacho- Arroyo I. C/EBP β isoforms expression in the rat brain during the estrous cycle. <i>International Journal of Endocrinology</i> . 2015, 2015:674915.	

12.2. Capítulos de libros.....104

- Hansberg-Pastor V, González-Arenas A, Camacho-Arroyo I. 2014. Papel de las hormonas sexuales en el crecimiento de tumores cerebrales humanos. En: Mensaje Bioquímico. Vol. XXXVIII. Ed. Butanda Ochoa A, Guevara Flores A, Guevara Fonseca J, Matuz Mares D, Lara Lemus R, Torres Durán PV. Facultad de Medicina, UNAM. México D.F., México. 127-144. ISSN: 0188-137X.

Índice de abreviaturas

AD: dominio de activación transcripcional

AF: función de activación

bZIP: dominio básico con cierre de leucinas

ERE: elemento de respuesta a estrógenos

ERP: elemento de respuesta a progesterona

FKBP: inmunofilina de unión a proteínas de choque térmico

H3ac: histona 3 acetilada

H3K4/9me: lisina 4 o 9 de la histona H3 metilada

HAT: acetiltransferasa de histonas

HDAC: desacetilasa de histonas

IDH: isocitrato deshidrogenasa

IF: función de inhibición

MPTs: modificaciones post-traduccionales

NLS: secuencia de localización nuclear

NCoR: correpresor de receptores nucleares

NTD: dominio N-terminal

RA: receptor a andrógenos

RE: receptor a estrógenos

RD: dominio de regulación

RG: receptor a glucocorticoides

RPrI: receptor a prolactina

SMRT: mediador silenciador de los receptor de ácido retinoico y de hormona tiroidea

SRC: coactivador de receptores a esteroides

Resumen

Muchas de las acciones de la progesterona (P4) ocurren a través de su receptor intracelular, el receptor a progesterona (RP). Existen dos isoformas del receptor (RP-A y RP-B) que se transcriben de un mismo gen a partir de dos promotores. En distintos tipos de cáncer incluidos los astrocitomas se han observado diferencias en la tasa de expresión de las isoformas del RP. Los astrocitomas son los tumores primarios más frecuentes del sistema nervioso central (SNC) y en particular los glioblastomas, que representan el máximo grado de evolución (IV), son los más agresivos. En los astrocitomas, la P4 induce la proliferación, migración e invasión celulares. De manera interesante, la expresión del RP es directamente proporcional al grado de evolución del tumor. En los astrocitomas de alto grado de malignidad (grados III y IV), la isoforma predominante del receptor es RP-B, lo que sugiere una regulación diferencial de la expresión de dichas isoformas. En un análisis *in silico* se encontró que únicamente el promotor de RP-B cuenta con tres probables sitios de unión a las proteínas de unión al enhancer CCAAT (C/EBP). En este trabajo evaluamos el papel del C/EBP β en la regulación de la expresión de RP-B en líneas celulares de glioblastomas humanos. En las células U251-MG, D54 y U87-MG se observó una expresión diferencial de las isoformas del RP, donde RP-B fue más abundante que RP-A en las líneas U251-MG y U87-MG, mientras que en D54 se observó una proporción de 1:1. Asimismo, las células de glioblastoma expresaron las tres isoformas de C/EBP β (LAP1, LAP2 y LIP) con una predominancia de LAP2. Posteriormente, ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) mostraron que C/EBP β , la proteína específica (Sp1) y el receptor a estrógenos alfa (RE α) se unen al promotor de RP-B en las células U251-MG. El silenciamiento de C/EBP β en estas células indujo un incremento en la

expresión de RP-B. El tratamiento con estradiol (E2) redujo la unión de C/EBP β al promotor de RP-B desde las 3 h hasta las 48 h y en las células U251-MG silenciadas para C/EBP β incrementó la expresión de RP total y de RP-B. El receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), la ciclina D1 y la proteína de adhesión vascular 1 (VAP-1) son genes blanco de la P4 que se regulan de manera diferencial por C/EBP β y RP en células silenciadas. Los datos muestran que C/EBP β regula negativamente la expresión de RP-B en células derivadas de un glioblastoma humano.

Abstract

Many progesterone (P4) actions are mediated by its intracellular receptor (PR), which has two isoforms (PR-A and PR-B) that are transcribed from separate promoters of a single gene. Differential isoform expression ratios have been observed in several types of human cancers such as astrocytomas, the most frequent and aggressive brain tumors. P4 induces astrocytoma cell proliferation, migration, and infiltration. Interestingly, PR isoforms expression is directly correlated with the tumor evolution grade, being PR-B the predominant isoform. An *in silico* analysis showed three putative CCAAT/Enhancer Binding Protein (C/EBP) binding sites at PR-B promoter only. In this study, we evaluated the role of C/EBP β in the regulation of PR-B expression in grade IV derived human astrocytoma (glioblastoma) cell lines. U251-MG, D54, and U87-MG cell lines expressed different ratios of both PR isoforms, as well as all three C/EBP β isoforms (LAP1, LAP2 and LIP) with a predominance of LAP2. ChIP assays in U251-MG cells showed a significant binding of C/EBP β , specific protein 1 (Sp1) and estrogen receptor alpha (ER α) to PR-B promoter. C/EBP β knockdown in U251-MG cells increased PR-B expression while treatment with estradiol (E2) reduced C/EBP β binding to the promoter from 3 to 48 hours and upregulated the expression of total PR and PR-B in CEBP/ β knockdown cells. Epidermal growth factor receptor (EGFR), cyclin D1, and vascular adhesion protein 1 (VAP-1) are P4-induced genes that are differently regulated by CEBP/ β and PR in knockdown cells. These data show that C/EBP β negatively regulates PR-B expression in glioblastoma cells.

I. Introducción

La progesterona (P4) es una hormona esteroide que participa en la regulación de diversos procesos fisiológicos en el sistema nervioso central (SNC), como son la conducta sexual femenina, el estado de ánimo, la excitabilidad neuronal y la neuroprotección, así como en procesos patológicos como el crecimiento tumoral cerebral. Muchos de los efectos de la P4 están mediados por su receptor intracelular (RP), el cual es un factor de transcripción activado por ligando que presenta dos isoformas (RP-A y RP-B) [1,2]. Diversos estudios han encontrado que la P4 promueve el crecimiento de distintos tipos de cáncer y en astrocitomas, los tumores cerebrales más frecuentes y agresivos en el ser humano, esta hormona induce su proliferación, migración e invasión. En los astrocitomas, la expresión del RP es directamente proporcional al grado de evolución del tumor y RP-B es la isoforma predominante [3,4]. En diferentes modelos, en particular en cáncer de mama, se ha reportado una regulación por estrógenos de la expresión del RP [5,6]. Sin embargo, se desconocen otros mecanismos moleculares que regulan la expresión diferencial de las isoformas del RP en estos tumores.

II. Antecedentes

2.1. Tumores primarios del sistema nervioso central

Los tumores primarios del SNC conforman un grupo heterogéneo de tumores sólidos que surgen en distintas áreas del cerebro, tienen diferente potencial invasivo y un pronóstico variable. Entre los tumores del SNC, los gliomas representan el 27% de todos los tumores primarios en adultos. La etiología de estos tumores se desconoce y hasta el

momento se han determinado como factores de riesgo a la radiación ionizante y algunos síndromes genéticos [7,8]. De acuerdo con diversos estudios clínicos, experimentales y epidemiológicos se ha sugerido que las hormonas sexuales como la P4 y el estradiol (E2) juegan un papel importante en el desarrollo de estos tumores [4,9–12].

2.1.1. Características generales de los astrocitomas

La incidencia anual de tumores cerebrales primarios malignos a nivel mundial es de aproximadamente 3 por cada 100 mil individuos de acuerdo a las estadísticas del Registro Central de Tumores Cerebrales de los Estados Unidos (*Central Brain Tumor Registry of the United States*, CBTRUS, <http://www.cbtrus.org/index.html>) [8]. El 80% de los tumores cerebrales malignos son los gliomas, los cuales abarcan a los astrocitomas, oligodendrogliomas y ependimomas [7]. Los astrocitomas son los gliomas más frecuentes ($\approx 75\%$) y han sido clasificados por la Organización Mundial de la Salud en cuatro grados (I-IV) de acuerdo a sus características histopatológicas, aunque actualmente existe una subclasificación de acuerdo a sus características moleculares [7,13]. Los tumores de grado I o astrocitomas pilocíticos se presentan con más frecuencia en niños y adultos jóvenes de 0-19 años, son tumores que crecen lentamente, no invaden tejido adyacente y se consideran los tumores menos agresivos. Los astrocitomas pilocíticos se encuentran frecuentemente encapsulados por lo que pueden ser curados por resección quirúrgica, aunque cuando se presentan en adultos mayores a 60 años éstos tienen una menor tasa de supervivencia tras el tratamiento [14]. Los astrocitomas difusos o de grado II son tumores de baja malignidad con márgenes indefinidos lo que en muchos casos imposibilita una resección quirúrgica total y se requiere de una radioterapia complementaria. Son tumores que presentan atipia

nuclear, un lento crecimiento celular y la supervivencia media de los pacientes está entre 5 y 10 años [15,16].

Los astrocitomas de alto grado de malignidad incluyen a los anaplásicos (grado III) y a los glioblastomas (grado IV). Los tumores anaplásicos son infiltrantes y muestran células multinucleadas con atipia nuclear. Son tumores con una marcada actividad mitótica por lo que pueden progresar rápidamente a un glioblastoma. La supervivencia media de los pacientes con astrocitomas anaplásicos es de 3 a 5 años [17]. Los glioblastomas representan el 80% de todos los tumores malignos del SNC y el 69% de los astrocitomas. Son tumores que presentan una proliferación celular descontrolada, 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 14-16 meses, por lo que se les considera el tipo de glioma más agresivo. Clínicamente los pacientes presentan dolores de cabeza, deficiencias neurológicas focales, confusión, pérdida de memoria, alteraciones en la personalidad e incluso crisis convulsivas. Las terapias para los astrocitomas de alto grado de malignidad es una máxima resección quirúrgica para eliminar el volumen del tumor y reducir la presión intracraneal seguida de una radio y/o quimioterapia principalmente con temozolomida. Sin embargo, estos tumores son altamente recurrentes y en muchos casos se vuelvan resistentes a las terapias [17–20].

Clínicamente, los glioblastomas se han subdividido de acuerdo a las mutaciones que presentan en el gen de la isocitrato deshidrogenasa 1 y 2 (IDH1/2) y la metilación del gen de la enzima O6-metilguanina metiltransferasa del DNA (MGMT) [21]. La enzima MGMT cataliza una enzima de reparación del DNA que remueve grupos alquilo inducidos por un agente quimioterapéutico como la temozolomida [21]. La IDH es una enzima que cataliza la carboxilación oxidativa del isocitrato a α -cetoglutarato. Las mutaciones en la IDH, las

cuales alteran el sitio activo de la enzima, provocan que la enzima convierta al isocitrato en 2-hidroxiglutarato (2-HG). Este metabolito inhibe a enzimas que regulan la metilación del DNA, lo que genera un fenotipo de hipermetilación del DNA y susceptibilidad a los tratamientos, por lo que se le considera un marcador de pronóstico favorable [21,22].

Los glioblastomas que no surgen de la evolución progresiva de tumores de bajo grado se les llama glioblastomas *de novo* o primarios y se caracterizan por expresar la forma silvestre de la IDH1. Son los glioblastomas más frecuentes ($\approx 90\%$ de los casos) y se presentan principalmente en pacientes mayores a 62 años. Los que derivan de una progresión paulatina de tumores de grado II a grado IV se les conoce como glioblastomas secundarios. Éstos son menos frecuentes, tienen mutada la IDH1 (el 70% de los astrocitomas de grado III la presentan) y tienden a ocurrir en pacientes menores de 45 años. Aunque no existen diferencias histológicas entre ellos, se ha observado que los que presentan mutaciones en la IDH1 tienen un mejor pronóstico, pues responden mejor a las terapias [17,23].

En los glioblastomas primarios se han descrito también otras alteraciones genéticas como son la ganancia del cromosoma 7 y la pérdida del 10, amplificación del gen del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y del receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR), mutaciones en el gen del homólogo de fosfatasa y tensina (PTEN) y de la telomerasa (TERT). Estas alteraciones se han detectado también en astrocitomas de grados II y III que no presentan la mutación en la IDH, lo que abre la posibilidad de que algunos glioblastomas primarios se desarrollen a partir de una lesión previa [23–25]. En los glioblastomas secundarios además de la mutación en la IDH se han observado mutaciones en el gen TP53 y en el del síndrome alfa-talasemia con retraso mental ligado al cromosoma X (ATRX) [26,27].

Con base en los estudios del *National Institute of Health* y del proyecto Atlas del Genoma del Cáncer (*Cancer Genome Atlas*, TCGA) los glioblastomas se han dividido a su vez en subtipos moleculares de acuerdo a los perfiles de expresión de EGFR, PDGFR, IDH1 y neurofibromatosis tipo 1 (NF1). Los subtipos se denominan clásico, mesenquimal, proneural y neural. Los glioblastomas clásicos presentan una amplificación del gen EGFR, pérdida del cromosoma 10 y un perfil de expresión de tipo astrocítico, mientras que el subtipo mesenquimal se caracteriza por presentar mutaciones en NF1 y PTEN y un perfil de expresión mesenquimal. El subtipo proneural se define por presentar el gen PDGFR amplificado, mutaciones en TP53 e IDH1 y mostrar un perfil de expresión de tipo oligodendrocítico. Por último, el subtipo neural presenta un perfil de expresión de tipo neuronal así como marcadores de astrocitos y oligodendrocitos. Los glioblastomas secundarios suelen presentar por lo general un genotipo proneural, mientras que los primarios comprenden un grupo de tumores más heterogéneo [20,27,28].

A pesar de los avances en las terapias y en las técnicas de imagenología, los pacientes con glioblastomas tienen en general un mal pronóstico. La supervivencia media de 5 años es menor al 10% y la tasa de mortalidad es prácticamente del 100%, lo que los convierte en los tumores cerebrales más letales. El mal pronóstico se debe en muchos casos a la propensión de estos tumores a recurrir y se ha estimado que la recurrencia es inevitable tras una supervivencia media de 32-36 semanas [29,30]. Para explicar su recurrencia se han planteado dos modelos: la hipótesis de la evolución clonal y la hipótesis de las células troncales cancerosas, aunque ambos modelos no son mutuamente excluyentes. El primero 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, sostener el crecimiento prolongado del tumor o de iniciar la formación de uno nuevo. Las células troncales cancerosas son relativamente quiescentes, tienen una mayor resistencia al daño al DNA y son muy eficientes exportando moléculas dañinas como las drogas quimioterapéuticas, por lo que son difíciles de eliminar con terapias convencionales que atacan células altamente proliferativas [31].

Debido a las características invasivas y de recurrencia de los glioblastomas, se han buscado alternativas terapéuticas como aquellas basadas en el uso de hormonas o de antagonistas a receptores a hormonas esteroides, ya sea como terapias adyuvantes o paliativas [32–34]. Una de ellas ha sido el uso de la mifepristona o RU486, un antagonista del receptor a progesterona (RP) que es capaz de cruzar la barrera hematoencefálica y mejorar la respuesta a la quimioterapia [35,36]. Es por ello que los mecanismos moleculares que regulan la expresión del RP en estos tumores son de gran importancia para plantear nuevas estrategias para el tratamiento de los astrocitomas.

2.2. La progesterona y su receptor (RP) en astrocitomas de alto grado de malignidad

La P4 y su receptor intracelular, RP, juegan un papel importante en el crecimiento de los astrocitomas de alto grado de malignidad. Se ha observado que durante el embarazo, los altos niveles séricos de P4 promueven el crecimiento y la recurrencia del tumor [37,38]. Asimismo, se ha reportado que la P4 tiene efectos en modelos tanto *in vitro* como *in vivo*. El tratamiento con una concentración fisiológica de P4 (10 nM) induce la proliferación de líneas celulares derivadas de un astrocitoma de grado III (U373) y de un glioblastoma (D54) [12] y promueve la migración e invasión de las células de glioblastoma humano

U251-MG y U87-MG [11]. En un modelo *in vivo*, la P4 promueve el crecimiento y la infiltración de las células U373 xenoinjertadas en la corteza cerebral de la rata [39]. En estos modelos, el efecto de la P4 es mediado por el RP, dado que la mifepristona bloquea el efecto de la hormona [11,12,39]. En estudios en ratones con tumores generados por el xenoinjerto de las células de glioblastoma U87-MG se encontró que el tratamiento con el antagonista RU486 reduce el tamaño del tumor [40] e inhibe el crecimiento de líneas celulares de glioblastoma *in vitro* [34]. Se ha sugerido que los efectos de la P4 sobre la proliferación, migración e invasión de los glioblastomas se deben a la regulación de genes importantes para dichos procesos como son el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), EGFR y la ciclina D1 [41].

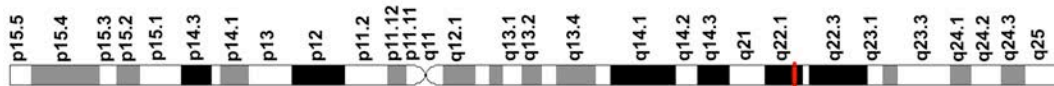
La expresión del RP se correlaciona de manera directa con el grado de evolución de los astrocitomas, lo que sugiere que el RP tiene un fuerte potencial oncogénico en estos tumores [4]. Estudios por inmunohistoquímica muestran que los astrocitomas de grados III y IV expresan el RP en mayor proporción que los de grados I y II y que la isoforma predominante es RP-B [3,42–44]. En líneas celulares de astrocitomas humanos se ha encontrado una expresión diferencial de las isoformas del RP, pues en la línea U373 (grado III) se encontró una relación RP-B:RP-A de 3:1, mientras que en las células D54 (grado IV) se encontró una proporción de 1:1 [45,46]. La tasa de expresión de las isoformas del RP es importante, pues la P4 puede tener diversos efectos dependiendo del patrón de expresión de las mismas [47]. En cáncer de mama se ha reportado que los tumores que sobre-expresan RP-A tienen un peor pronóstico [48]. En cambio, en astrocitomas la sobre-expresión de RP-A inhibe el crecimiento de las células U373 tratadas con P4, lo que sugiere un posible efecto anti-proliferativo de esta isoforma [45]. Incluso, en biopsias de astrocitomas se encontró una relación inversamente proporcional entre la expresión de RP-A y el marcador

de proliferación Ki-67 [44]. Sin embargo, se desconocen otros posibles factores que regulen la expresión diferencial de las isoformas del RP en glioblastomas.

2.3. Estructura y función del RP

El RP es un factor de transcripción activado por ligando que está clasificado dentro de la superfamilia de receptores nucleares y se cataloga dentro de la clase de receptores a hormonas esteroides, entre los que también se encuentran los receptores a estrógenos α y β (RE α/β), el receptor a glucocorticoides (RG), el receptor a mineralocorticoides (RM) y el receptor a andrógenos (RA) [49–51]. En humanos existen dos isoformas principales del RP, RP-A (94 kDa) y RP-B (114 kDa), las cuales también han sido descritas en peces, anfibios, aves, reptiles y varias especies de mamíferos [52–57]. RP-A y RP-B tienen diferente función y regulación dependiendo del contexto celular. En humanos, la expresión del gen del RP (cromosoma 11q22.1, **Figura 1**) depende de su estructura particular, pues las isoformas del RP se transcriben a partir de dos promotores, y de su regulación tanto epigenética como aquella mediada por estrógenos [58].

A) Cromosoma 11



B) Locus del RP



C) Características generales del locus del RP

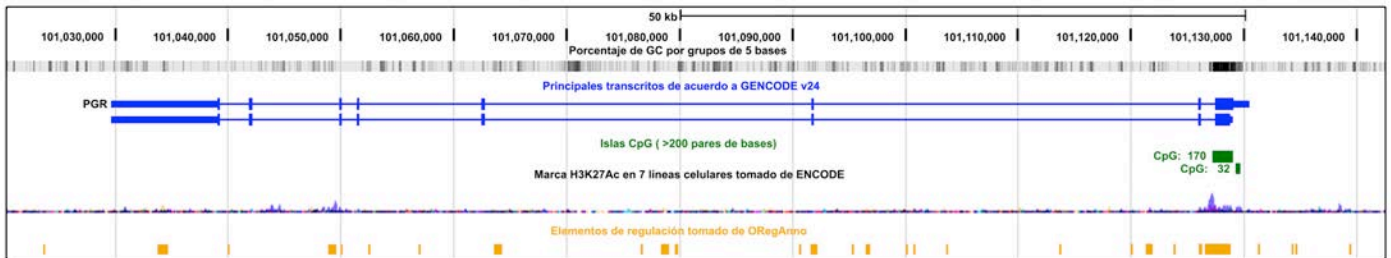


Figura 1. Locus del gen del RP en humanos. **A)** El esquema muestra el cromosoma 11 con las posiciones en el brazo corto (p) o en el brazo largo (q). El gen del RP se encuentra localizado en la posición q22.1, marcado en el esquema con una línea roja. **B)** Ampliación de la región del locus del RP (posición marcada con corchetes y cabeza de flecha), el cual se encuentra en la hebra negativa (3'-5') (flecha roja) y flanqueado por los genes que codifican para la proteína activadora 42 de la GTPasa Rho (ARHGAP42), la proteína transmembranal 133 (TMEM133) y el RNA antisentido 1 del RP (PGR-AS1). **C)** El esquema indica el porcentaje de GCs en la región del locus del RP, los dos principales transcritos, las islas CpG, el enriquecimiento de la acetilación de la lisina 27 de la histona H3 (H3K27Ac) y los sitios de unión a distintos factores de transcripción como son el RE α , FOXA1, C/EBP β , STAT1 y MAFK. Los datos fueron obtenidos de la base de datos Genome Browser (<http://www.genome.ucsc.edu/index.html>, Universidad de Santa Cruz, California, USA). ORegAnno: *Open Regulatory Annotation*, ENCODE: *Encyclopedia of DNA Elements*.

2.3.1. Estructura proteínica del RP

La cadena polipeptídica del RP está dividida estructural y funcionalmente en varios dominios. El dominio del extremo amino terminal (NTD) es el menos conservado. Este

dominio tiene funciones de activación (AF-1 y AF-3) que participan en la regulación de la transcripción de genes blanco [49,51,59]. La isoforma RP-B en el humano es 164 amino ácidos más larga en su dominio NTD que RP-A y en dicha región se localiza la función AF-3 específica de RP-B. El dominio más conservado comprende al dominio de unión al DNA (DBD) el cual contiene dos dedos de zinc que participan en la dimerización del receptor y en la unión al 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 dominio carboxilo terminal (C-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 [49,60,61].

Por otro lado, hacia el dominio C-terminal se encuentra una región en forma de horquilla que contiene la secuencia de localización nuclear (NLS) y los sitios de unión para las proteínas chaperonas como Hsp90 que mantienen a los receptores en un estado inactivo. En el extremo C-terminal se encuentra el dominio de unión al ligando (LBD), una función de activación (AF-2) dependiente de ligando, una segunda secuencia de localización nuclear y varios sitios de unión a chaperonas y correguladores [49,62,63] (**Figura 2**).

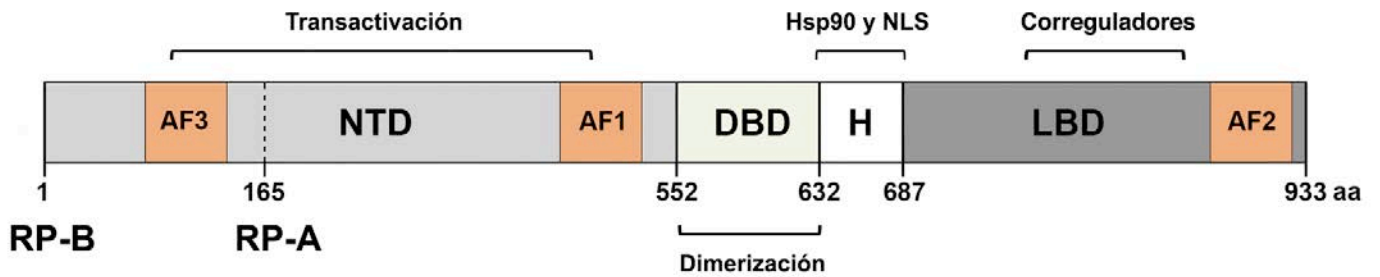


Figura 2. Representación esquemática de los dominios del RP en humanos. El receptor consta de un dominio poco conservado hacia el extremo N-terminal (NTD) que cuenta con dos funciones de activación (AF-1 y AF-3) que participan en la regulación de la transcripción de los genes blanco. El dominio de unión al DNA (DBD), que se caracteriza por tener dos dedos de zinc, y el dominio de dimerización. En el dominio de horquilla (H) se encuentran las secuencias de localización nuclear (NLS) y de unión a chaperonas (Hsp90). En el extremo C-terminal se encuentra el dominio de unión al ligando (LBD), la región de unión a corre reguladores y una función de activación (AF-2) dependiente de ligando. En el esquema también se muestran el número de aminoácidos (aa) que tiene la proteína y cada uno de los dominios, así como las diferencias en el tamaño de isoformas RP-A y RP-B (línea punteada).

2.3.2. Mecanismos de acción

El mecanismo de acción clásico del RP, al fungir como un factor de transcripción, implica la regulación de la transcripción de genes blanco. En ausencia de hormona el receptor se encuentra en un estado inactivo al estar asociado a las proteínas de choque térmico Hsp70/Hsp90 y Hsp40, a la proteína p23 y otras co-chaperonas como las proteínas FKBP 51 y 52. La asociación con chaperonas le confiere al receptor una conformación específica que le permite unir a la hormona con gran afinidad (**Figura 3**). Cuando la P4 entra por difusión simple a la célula e interactúa con su receptor provoca un cambio conformacional que promueve la disociación del receptor de las chaperonas, su fosforilación por diversas cinasas como MAPK, la dimerización con otra molécula de RP y su translocación al núcleo. Una vez en el núcleo, el receptor activo interactúa con los

elementos de respuesta a P4 (ERP) de los genes blanco y se reclutan diversos coactivadores como son los de la familia p160 (SRC-1, 2 y 3) y otros remodeladores de la cromatina como la acetiltransferasa PCAF que en conjunto promueven una conformación más laxa de la cromatina y la unión de la maquinaria basal de la transcripción, y por lo tanto la expresión de los genes blanco [60,63–65] (**Figura 3**). El RP también puede activar la transcripción de genes que carecen de ERPs al unirse a otros factores de transcripción como las proteínas Sp1, la proteína de activación 1 (AP-1), los coactivadores p300 y la proteína de unión a CREB (CBP/p300) y el factor nuclear NFκB [66–69]. Tras la transcripción, el RP, al igual que los coactivadores, es degradado de manera dependiente de ligando a través de la vía ubiquitina-proteosoma [70–72].

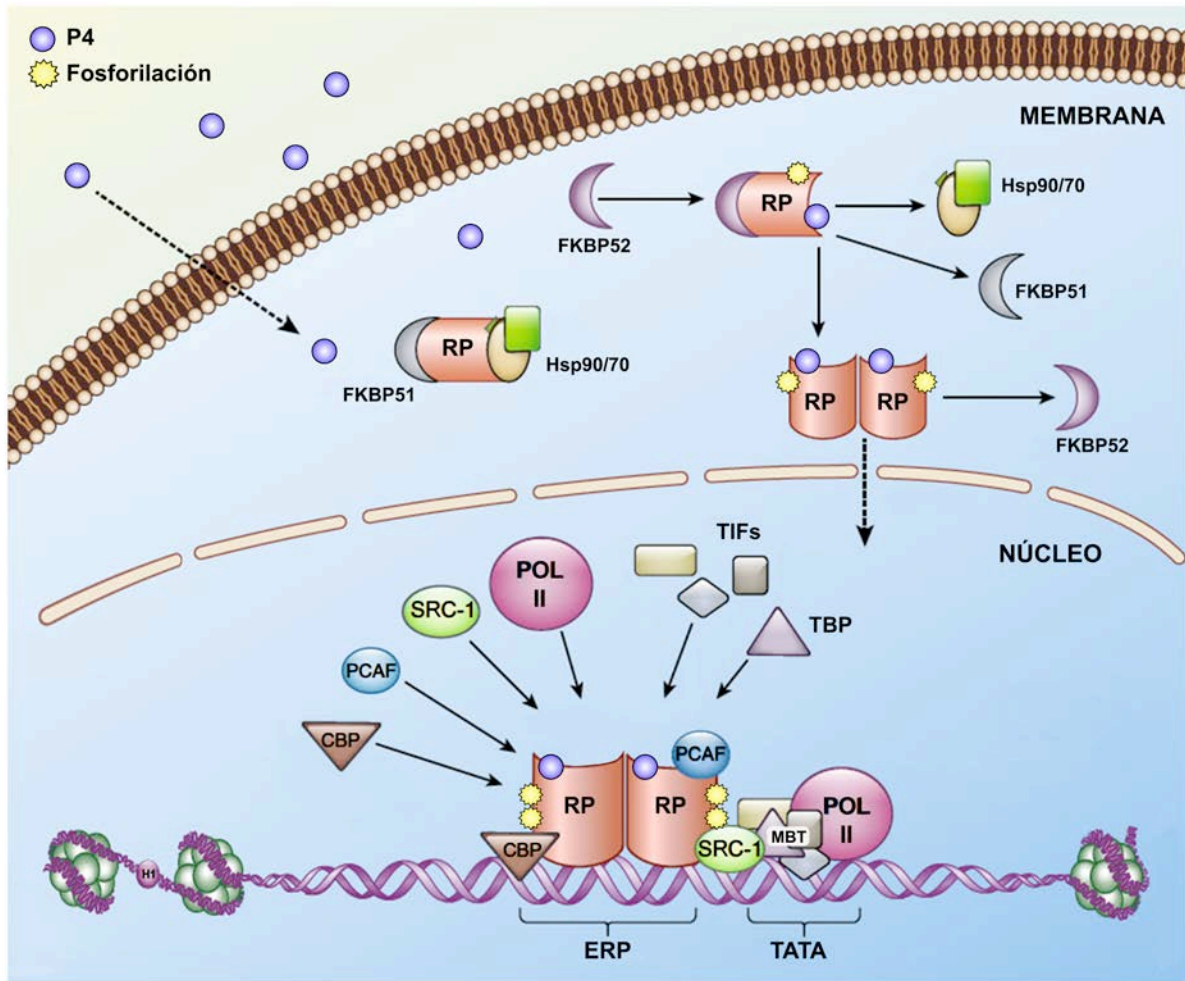


Figura 3. Mecanismo de acción clásico del RP. En ausencia de P4, el RP interactúa con complejos de chaperonas (Hsp90/70) y co-chaperonas (FKBP51 y p23) que lo mantienen en un estado inactivo y en una conformación que permite la unión del ligando. Cuando la P4 entra a la célula e interacciona con el receptor se produce un cambio conformacional que promueve la fosforilación del receptor y permite la disociación del complejo Hsp-FKBP51-p23 y su asociación con la co-chaperona FKBP52 que facilita la dimerización. Después, el receptor es translocado al núcleo donde se une a elementos de respuesta a progesterona (ERP) localizados en las regiones reguladoras de los genes blanco. El RP induce la transcripción mediante la interacción con coactivadores y remodeladores de la cromatina como SRC-1, CBP y PCAF. Esto a su vez promueve la unión de la maquinaria basal de la transcripción (MBT) conformada por los factores de inicio de la transcripción (TIFs), la proteína de unión a cajas TATA (TBP) y la RNA polimerasa II (Pol II) [73].

Aunado al mecanismo clásico, hay reportes que indican que la regulación de la expresión mediada por RP es más compleja, pues se ha observado que el RP se encuentra en el núcleo y unido en complejos represivos a los promotores de 20% de los genes blanco en ausencia de un estímulo hormonal [74]. También se ha reportado que el RP en forma de monómero se une de manera cooperativa para inducir la transcripción [75] y que las chaperonas y co-chaperonas modulan su actividad transcripcional así como su importación al núcleo [63,76]. De acuerdo al contexto celular y la expresión de correguladores, ya sea coactivadores o correpresores, la capacidad transcripcional del RP se ve modificada. Incluso, los ERPs suelen ser medios elementos que pueden estar localizados en regiones muy alejadas de los promotores de los genes blanco [2,77–79] lo que, aunado al estado de activación o represión de la cromatina de cada promotor, afecta la capacidad transcripcional del receptor. Asimismo, es importante considerar la presencia de las dos isoformas del RP en cada contexto celular, ya que tienen diferentes propiedades transcripcionales.

2.3.3 Isoformas del RP

A pesar de tener la misma afinidad por su ligando, las isoformas del RP tienen diferentes funciones de acuerdo con su estructura, el contexto celular y sus genes blanco. Las primeras diferencias funcionales de las isoformas se encontraron en ratones *knockout* (KO). En animales KO para RP-B se observó que dicha isoforma es fundamental para el desarrollo de la glándula mamaria mientras que aquellos que son KO para RP-A son infértiles, lo que indica que las isoformas tienen funciones tejido-específicas [80,81]. 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 [82,83]. Tanto RP-A como 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 [84,85]. La presencia de secuencias de importación y exportación nuclear aseguran que haya un intercambio continuo entre el citoplasma y el núcleo. Este equilibrio dinámico favorece la compartimentalización de las isoformas del receptor modificando así su actividad transcripcional [86].

Ambas isoformas tienen la misma afinidad por el DNA, pero su capacidad de transactivación es diferente. De hecho, el RP puede unirse al DNA ya sea como heterodímero (A::B) o como homodímero (A::A o B::B), todos con diferentes propiedades de activación transcripcional [87,88]. 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 del gen blanco [89,90]. Sin embargo, la mutación en AF-3 no convierte a la isoforma RP-B en RP-A, lo que sugiere que tienen diferentes propiedades transcripcionales dependiendo de su estructura [90].

Las diferencias en la actividad transcripcional de las isoformas también dependen del tipo de correguladores que recluten y de la abundancia de los mismos [88]. 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. Puesto que las isoformas toman una conformación diferente en la célula debido a la diferencia en longitud de su cadena polipeptídica, esto les confiere distintas afinidades por los correguladores [2,90,91]. 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 (**Tabla 1**) [2,88,92]. Los

correguladores 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), lo que modifica el estado de activación de la cromatina [88,93,94].

Por otro lado, las isoformas del RP presentan diferentes modificaciones post-traduccionales (MPT) como la fosforilación, ubiquitinación, SUMOilación y acetilación. El RP tiene 15 sitios de fosforilación reportados, de los cuales 5 se encuentran únicamente en la isoforma RP-B, lo que le confiere una actividad diferente con respecto a RP-A (**Tabla 1**). La fosforilación puede ocurrir de manera basal, en presencia de ligando o tras la activación de cinasas como MAPK, la cinasa dependiente de cilina 2 (CDK2) o por la proteína cinasa C (PKC). También se sabe que la SUMOilación puede reprimir la actividad transcripcional y que la ubiquitinación promueve la degradación del receptor [95–98].

Tabla 1. Principales características de las isoformas del RP

Características	RP-A	RP-B
Peso molecular	94 kDa	114 kDa
Región N-terminal	Trunca	Completa
Funciones de activación (AF)	2	3
Función de inhibición (IF)	Activa	Inactiva
Sitios de fosforilación	9	15
Preferencia de unión a correguladores	Correpresores	Coactivadores
Principal actividad transcripcional	Represor	Activador

La estructura diferencial de las isoformas del RP, la dimerización, las MPTs y el reclutamiento de distintos coactivadores confiere respuestas tejido específicas y una regulación diferencial de los genes blanco. 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 [52,99].

2.4. Regulación de la expresión del gen del RP

El gen del RP en humanos consta de 8 exones y tiene dos promotores a partir de los cuales se transcriben las dos isoformas del receptor. Los promotores se localizan con respecto al sitio de inicio de la transcripción (TSS +1), de -711 a +31 pb (RP-B) y +464 a +1105 pb (RP-A) (**Figura 4**). Por medio de estudios de hipersensibilidad a la DNAsa1 (*DNA footprinting*) se determinó que el promotor del RP-A (+464 a +1105) tiene tres posibles sitios de inicio de la transcripción (+751, +761 y +842) mientras que el promotor de RP-B (-711 a +31) tiene dos sitios de inicio de la transcripción en +1 y +15. De las características principales de ambos promotores es que carecen de una típica caja TATA y que son inducibles por estrógenos a través del RE [58]. La región promotora tiene elementos de respuesta a estrógenos (ERE) así como sitios de unión a AP-1 y Sp1 (**Figura 4**).

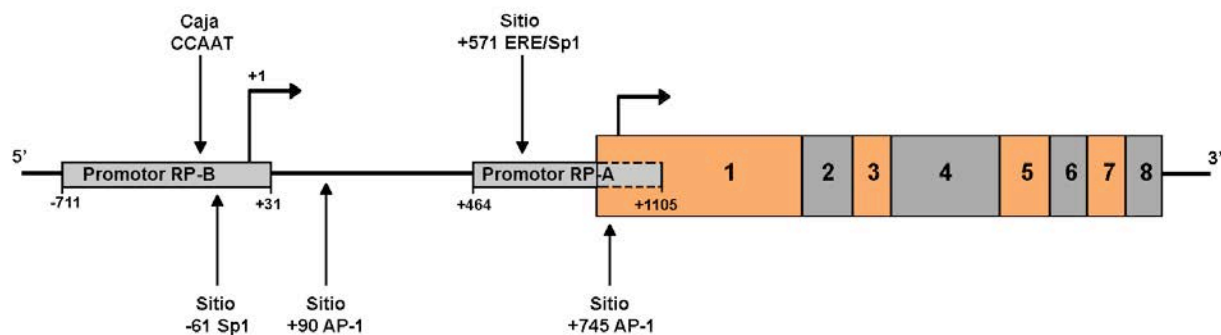


Figura 4: Estructura del gen del RP en humanos. El gen está compuesto por ocho exones (1-8) y tiene dos promotores a partir de los cuales se transcriben las dos isoformas del receptor, RP-A y RP-B. Las flechas en ángulo representan los sitios de inicio de la transcripción (TSS), de los cuales el que se localiza en el promotor de RP-B se le considera el sitio +1. El esquema también muestra la localización de los promotores con respecto al TSS +1 y los diferentes sitios de unión a las proteínas Sp1, AP-1, RE (ERE) así como la caja CCAAT conservada.

2.4.1. Regulación epigenética

La expresión del gen del RP es regulada por mecanismos epigenéticos, los cuales abarcan a todos aquellos eventos que modifican la expresión génica sin alterar la secuencia del DNA. Entre los diferentes mecanismos se encuentran la metilación del DNA, las MPTs de las histonas y los RNAs no codificantes. La metilación del DNA ocurre en el carbono 5 de la citosina en un contexto de dinucleótidos CpG, los cuales, cuando se encuentran en alta frecuencia, forman islas CpG que se localizan generalmente en regiones promotoras de diversos genes. La metilación del DNA genera cambios en la cromatina que frecuentemente conllevan a silenciar regiones transcripcionalmente activas [100,101].

El gen del RP es blanco de ser metilado puesto que tiene islas CpG tanto en el promotor de RP-A como en el exón 1 (**Figura 1C**), mientras que el promotor de RP-B carece de ellas [102]. Esta diferencia determina de manera importante la regulación diferencial de las

isoformas, pues se ha observado por ejemplo, que durante la labor de parto, el promotor de RP-B se hipermetila y se silencia, mientras que el de RP-A se desmetila y se activa, provocando así un cambio en la expresión de las isoformas [103,104]. Otros estudios se han realizado en modelos de cáncer de endometrio, de cerebro, de mama y en leucemias en los que se ha observado una hipermetilación, ya sea de la región promotora completa del gen del RP o de alguno de los promotores, lo que conlleva a alteraciones en los niveles de expresión del receptor y de sus isoformas [46,105–107]. De manera interesante, la expresión de RP se puede restablecer con tratamientos con inhibidores de las metiltransferasas de DNA como son la azacitidina o zebularina [108,109].

Entre las MPTs de las histonas se encuentran la acetilación, la metilación, la fosforilación y la ubiquitinación. 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 [110]. La acetilación de la lisina 27 de la histona 3 (H3K27Ac) se encuentra enriquecida en la región promotora y en el primer exón (**Figura 1C**). En algunos de los ERE localizados en regiones distales al promotor del RP se encuentran asociadas acetilasas de histonas, por lo que la acetilación en estas regiones es importante para inducir la transcripción del gen del RP [111]. De hecho, en un estudio en la línea celular de cáncer de mama C4 que no expresa el RP se encontró una pérdida local de la acetilación de histonas en la región promotora de gen del RP, lo cual podría afectar la unión de factores de transcripción o su capacidad de formar un complejo activo de transcripción [112]. Por otro lado, el silenciamiento del RE α promueve el decremento en marcas de cromatina activa como la acetilación de la histona H3 (H3ac y H3K9ac) y la dimetilación de la lisina 4 de la histona H3 (H3K4me2) [113]. 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 del promotor de RP-A y desmetila a la H3K4 lo que 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 [104,114].

Además de la metilación del DNA y las MPTs de las histonas, el gen del RP es blanco de la regulación por RNAs no codificantes. Entre ellos se encuentran los microRNAs (miRNAs), pequeños RNA endógenos no codificantes de 18 a 22 nucleótidos que regulan la expresión de genes a nivel post-transcripcional. Estos miRNAs se unen a un mRNA blanco por apareamiento de bases e inducen su degradación o inhiben su traducción [115]. La expresión del RP es inhibida por la unión de miR-423-5p a su región promotora lo que reduce la unión de la RNA polimerasa II y promueve un incremento de la marca represiva H3K9me [116]. En células epiteliales de tejido mamario de ratón se ha observado que el miR-126-3p inhibe la expresión del RP al unirse a su región 3'UTR y esto a su vez reduce la proliferación de las células [117]. Por otro lado, en primates se ha observado que un RNA largo no codificante (lncRNA) que se transcribe desde el promotor del RP-A hasta unas 70 kb en dirección 5' el cual se sobrelapa con la región promotora y promueve la expresión del RP-A (**Figura 1B**). A su vez, estos lncRNAs son blanco de miRNAs que junto con la proteína argonauta 2 regulan negativamente la expresión del RP-A [118] lo que sugiere una interacción muy específica entre los diferentes tipos de RNAs no codificantes.

2.4.2. Regulación de la expresión del RP mediada por estrógenos

En humanos, la regulación transcripcional del RP mediada por estrógenos se ha estudiado en diferentes tipos celulares, pero principalmente en las líneas celulares de cáncer de mama MCF-7 y T47D. Los modelos clásicos de la acción de estrógenos han propuesto

que el RE una vez unido a su ligando induce la expresión de genes blanco tras reconocer a los elementos de respuesta a estrógenos (ERE), secuencias palindrómicas (5'-GGTCAnnnTGACC-3') localizadas en el DNA. A pesar de esto, ninguno de los promotores del RP tiene una secuencia ERE palindrómica, únicamente RP-A tiene un medio ERE [5,49,58]. 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 AP-1 y Sp1 [49].

En el promotor de la isoforma RP-A la región que va de +571 hasta +595 contiene un medio ERE (TGACC) seguido de dos sitios de unión a Sp1, uno distal (+580 a +585) y otro proximal (+590 a +595). A esta región se le conoce como el sitio +571 ERE/Sp1 (ver **Figura 4**). El medio ERE y el sitio Sp1 distal están muy conservados en humano, rata y ratón, mientras que el sitio Sp1 proximal, menos conservado, tiene una secuencia muy similar a la secuencia consenso de unión a Sp1 [5]. Se sabe que el RE α es capaz de interaccionar con la proteína Sp1 a través de sus dominios DBD y LBD y que la unión de Sp1 al DNA promueve el reclutamiento del RE α y su unión al ERE. Tanto el sitio Sp1 proximal como el distal son importantes para inducir la respuesta a estrógenos y la distancia que hay de ambos sitios con respecto al medio ERE es fundamental para la unión cooperativa de los dos factores de transcripción [5,119,120]. No obstante, mutaciones en el ERE que inhiben la asociación del RE α al DNA aumentan la transcripción del gen del RP por lo que se sugiere que los sitios Sp1 por sí mismos pueden inducir la respuesta a estrógenos. Al parecer, la unión de Sp1 al sitio +571 ERE/Sp1 mantiene la transcripción basal del RP en ausencia de estrógenos [5].

En cuanto al promotor de la isoforma RP-B, éste tiene una caja CCAAT conservada (-70 a -66) y dos sitios adyacentes de unión a Sp1 (-61 a -53 y -49 a 41) [6,58]. 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 promueve la unión de Sp1, pero no se une directamente al DNA. La interacción del RE α con el complejo Sp1-DNA contribuye a la expresión del gen del RP inducida por E2 [6].

Además de estos sitios, existe un sitio de unión a AP-1 (TGAGTGA) localizado en +90 a +96 que se encuentra en una región ubicada entre ambos promotores. El sitio difiere de una secuencia consenso de unión a AP-1 (TGA^G/C_TCA) por una única base y se encuentra junto a un medio 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 [121].

Existe otro sitio AP-1 (+745 a +751) que se encuentra en el promotor del RP-A y está 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 al 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 [122].

La respuesta mediada por estrógenos del gen del RP puede por tanto ocurrir en presencia de sitios AP-1 o Sp1. De acuerdo con los estudios mencionados, 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 proporción que el resto de los sitios Sp1, lo que sugiere que éstos tienen diferentes capacidades de activar la transcripción y no son completamente equivalentes [123].

Por otro lado, existen varios elementos *cis* que se localizan lejos del promotor más distal y que juegan un papel importante en la regulación de la expresión del gen. A través de estudios genómicos en las células MCF-7 se encontraron regiones reguladoras que se asocian a RE α ubicadas hacia la región 5' entre 48-311 kb del TSS +1. Estos ERE son capaces de conferir una respuesta a estrógenos, aunque varía su capacidad de inducir la transcripción. Mediante ensayos de captura de la conformación cromosómica (3C), se determinó que 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 [111].

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). Estudios recientes en células T47D han demostrado que el RP es inducido por ciclina D1 y 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 la ciclina D1 [124].

Además de la regulación por estrógenos se han reportado unos pocos factores de transcripción que regulan la expresión del RP. En células de la granulosa de ratón, la hormona luteinizante induce la expresión del RP a través de la activación de Sp1/Sp3 [125]. En células de cáncer de mama el factor GATA5 se une al promotor de RP-B e induce su expresión [126], mientras que el factor Ets-1 forma complejos con el RE α y los coactivadores SRCs para promover la transcripción del RP [127]. También se ha reportado que el subtipo β de la proteína de unión al enhancer CCAAT (C/EBP β) participa en la expresión del RP en células de endometrio humano y en la glándula mamaria de ratón

[128,129]. Sin embargo, se desconocen los mecanismos moleculares a través de los cuales este factor participa en la regulación del RP.

2.5. Factores de transcripción de la familia de proteínas de unión al enhancer CCAAT (C/EBP)

En eucariontes existen una clase de factores de transcripción que presentan en su extremo C-terminal un dominio de unión a DNA y de dimerización que consta de una región rica en aminoácidos básicos seguida de un motivo de dimerización llamado “zipper” de leucinas, por lo que en conjunto se le conoce como dominio bZIP. En esta clase de factores de transcripción se encuentran clasificadas las familias de proteínas C/EBP, Fos, Jun y CREB [130]. Las proteínas C/EBP regulan una gran cantidad de procesos fisiológicos como son el metabolismo energético, procesos de inflamación, hematopoyesis, adipogénesis, ciclo celular, proliferación y diferenciación celular. También se ha observado que la expresión de los C/EBPs se modifica en diversas condiciones fisiológicas y patológicas [131].

Se han caracterizado y clonado seis proteínas C/EBP de diversas especies y de acuerdo al orden cronológico de su descubrimiento se han clasificado como C/EBP α -C/EBP ζ . Todas la proteínas C/EBPs tienen la región C-terminal muy conservada (identidad de >90%), región donde se localiza el dominio bZIP. La dimerización de la proteína es un requisito para su unión al DNA y la especificidad de dicha unión está determinada por la secuencia de aminoácidos de la región básica. Debido que el dominio bZIP está muy conservado, las diferentes C/EBPs pueden formar heterodímeros con los demás miembros de la familia e incluso con otros factores bZIP, y a excepción de C/EBP ζ , todos pueden

interaccionar con la misma secuencia consenso *in vitro*. El sitio de unión de las C/EBPs al DNA tiene una secuencia consenso ${}^A/GTGCG^C/TAA^C/T$, sin embargo, pueden tolerar variaciones en la secuencia y en la mayoría de los casos la proteína se une a un medio elemento conservado seguido de una secuencia que contenga al menos dos pares de bases similares a la consenso [131–133]. El extremo N-terminal está muy poco conservado entre la familia y presenta dominios de regulación que tienen función ya sea de activación o de represión de la expresión génica. Los dominios de activación interactúan con la maquinaria basal de la transcripción, coactivadores y remodeladores de la cromatina para inducir la expresión de genes blanco [131,133].

2.5.1. Estructura y función de C/EBPβ

En humanos, el gen de C/EBPβ (20q13) carece de intrones y se transcribe en un único mRNA de aproximadamente 2 kb a partir del cual se traducen distintas isoformas. C/EBPβ presenta tres isoformas, dos largas llamadas LAP1 y LAP2 (por su nombre en inglés *liver-enriched activator protein*) de 48 y 45 kDa, respectivamente, y una isoforma pequeña de 20 kDa llamada LIP (*liver-enriched inhibitory protein*) [134–137]. El extremo N-terminal de C/EBPβ tiene siete regiones conservadas de las cuales cuatro son dominios de activación de la transcripción (AD, 1-4) (**Figura 5**) a través de los cuales interactúa con coactivadores y la maquinaria basal de la transcripción. Además, cuenta con tres dominios de regulación (RD, 5-7) que son importantes para mantener a la proteína en un estado inactivo. Los RD5 y 6 se unen a HDAC1 y promueve una conformación que inhibe la función de los dominios AD, mientras que RD7 inhibe la región básica (B) con lo cual reduce la unión de la proteína

al DNA. La fosforilación de los dominios RD induce cambios en su conformación que promueven la activación de C/EBP β [135,138–140] (**Figura 5**).

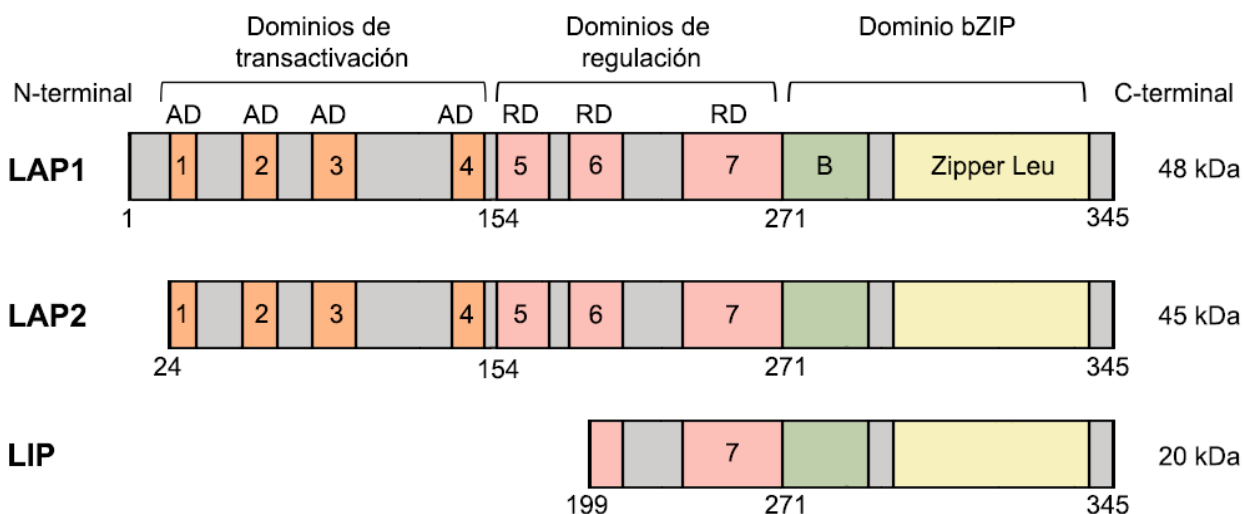


Figura 5. Estructura e isoformas de C/EBP β en humanos. La proteína C/EBP β tiene tres isoformas LAP1, LAP2 y LIP. Hacia el N-terminal se encuentran localizados los dominios de transactivación (AD, 1-4) y de regulación (RD, 5-7) y hacia el extremo C-terminal se encuentra el dominio bZIP conformado por la región de aminoácidos básicos (B) y el zipper de leucinas (Zipper Leu). La isoforma pequeña LIP carece de los dominios AD y parte del dominio RD6. En la figura se muestran el número de aminoácidos y el peso molecular de cada isoforma (tomada y modificada de [141,142]).

La regulación de la expresión de las tres isoformas de C/EBP β ocurre a nivel traduccional a partir de codones alternativos de inicio de la traducción (AUG1, AUG2 y AUG3) presentes en el mismo marco de lectura. La frecuencia relativa de inicio de la traducción de las isoformas largas ocurre debido a un escaneo imperfecto por parte de los ribosomas (*leaky scanning*). Los sitios de inicio de la traducción para LAP1 (AUG1) y LAP2 (AUG2) carecen de una óptima secuencia Kozak, lo que provoca el escaneo imperfecto. La traducción de LIP se regula por medio de un pequeño marco abierto de

lectura hacia el extremo 5' (uORF: *upstream open reading frame*) localizado entre AUG1 y AUG2 que forma una estructura de tipo tallo-asa. Cuando el ribosoma no escanea adecuadamente el sitio AUG1, se inicia la traducción desde el uORF lo que bloquea el inicio de la traducción a partir de AUG2 debido su proximidad. De esta manera se promueve la expresión de LIP, la cual también requiere de la participación de las proteínas de unión a repetidos CUG (CUGBP-1) y del factor de inicio de la traducción eIF-4E [134,143–145]. A pesar de que las isoformas largas difieren en 23 amino ácidos, se han reportado diferencias en su capacidad de inducir la transcripción de genes blanco. En modelos de ratones KO de LAP2 se demostró que los animales tienen menor número de defectos durante el desarrollo que aquellos que carecían de las tres isoformas [141,146] y en células epiteliales de mama de ratón se reportó que la ciclina D1 interacciona con LAP1 para promover la diferenciación de las células [147]. La región N-terminal específica de la isoforma LAP1 le permite interactuar con los complejos de remodelación de la cromatina ATP dependientes SWI/SNF y con el complejo mediador para inducir la transcripción de genes blanco [142]. En biopsias de cáncer de mama se ha observado que LAP2 se encuentra sobre-expresada, mientras que LAP1 se expresa únicamente en las células epiteliales normales [148]. En las células de cáncer epidérmico A431, la SUMOilación de la isoforma LAP1 y su asociación con HDAC4 promueve la represión del gen de la ciclooxigenasa 2 pero esto no ocurre con LAP2 [149]. En cambio, en células de carcinoma de pulmón, tanto LAP1 como LAP2 pueden inducir las expresión de la metaloproteinas 1 [150].

Dado que la isoforma pequeña LIP carece de los dominios de transactivación, se sugirió que podría actuar como un inhibidor dominante-negativo al formar heterodímeros no funcionales con las isoformas LAP. En preadipocitos, LIP interactúa con HDAC1 para

inhibir la expresión de C/EBP α e inhibir la diferenciación a adipocitos maduros [151]. Sin embargo, se ha observado que LIP puede también activar la transcripción del gen de la glicoproteína ácida $\alpha 1$ en ratones expuestos a un estímulo inflamatorio [152]. A pesar de las diferencias entre las tres isoformas, la tasa entre LAP/LIP varía de acuerdo con el contexto celular y se ha observado que esta proporción puede ser alterada por una variedad de condiciones [141]. En hepatocitos de ratón, la sobre-expresión de LAP induce un retraso en la entrada a la fase S del ciclo celular, mientras que la sobre-expresión de LIP tiene efectos opuestos [153]. En células normales epiteliales de mama de ratón, la sobre-expresión de LAP mantiene la transición mesénquima-epitelio mientras que la sobre-expresión de LIP promueve la transición epitelio-mesénquima así como la transformación oncogénica [154]. Los ratones que son knock-in para LIP son propensos a desarrollar cáncer en distintos tejidos y la supervivencia de los animales se reduce significativamente [155]. También se ha observado que esta isoforma se encuentra sobre-expresada en cáncer de mama alterando así la tasa LAP/LIP [135]. En las células de hepatoma Hep3B las isoformas LAP y LIP tienen funciones opuestas en la regulación de la supervivencia y muerte celular [156], por lo tanto, la tasa de LAP/LIP es fundamental para determinar el papel que juega C/EBP β en un determinado contexto celular.

2.5.2. C/EBP β en el SNC

C/EBP β se encuentra expresado en el SNC y se han reportado cambios en su expresión en respuesta a diferentes estímulos fisiológicos y patológicos [157,158]. En estudios en ratones KO para C/EBP β , los cuales son infértiles y tienen deficiencias metabólicas, se observó que muchos genes se ven alterados en las neuronas de estos animales [158]. En

roedores se ha detectado la expresión de C/EBP β en distintas áreas del cerebro como corteza, hipocampo, hipotálamo, cerebelo y alrededor de los ventrículos [159,160] y se ha observado que se expresa tanto en neuronas como en astrocitos [161,162]. La expresión y actividad de C/EBP β en cultivos neuronales primarios aumenta ante un estímulo despolarizante (KCl) y en presencia de dopamina o de Ca²⁺ [163–165]. En neuronas granulares del cerebelo de rata se reportó que la isoforma LAP1 se encuentra localizada en el citoplasma y en el núcleo, LAP2 sólo en el citoplasma y LIP únicamente en el núcleo [166]. En cultivos primarios de astrocitos, la expresión de C/EBP β aumenta en presencia de lipopolisacáridos (LPS), neuropéptidos y neurotransmisores y se ha observado que participa en la activación de la microglía [167–169]. Además, el metabolismo energético de los astrocitos es a su vez modificado por C/EBP β , donde la sobre-expresión de LAP incrementa la síntesis de glucógeno inducida por noradrenalina mientras que LIP la reduce [168].

Diferentes estudios han demostrado que C/EBP β participa en procesos de memoria y aprendizaje. En roedores, la expresión de C/EBP β aumenta de forma tiempo-dependiente en el hipocampo tras un entrenamiento de evitación pasiva [170,171] por lo que se ha sugerido que este factor junto con CREB participan en la formación y consolidación de la memoria [171,172]. En la amígdala, la expresión de C/EBP β es importante para la reconsolidación de la memoria tras la prueba de evitación pasiva [173]. Por otro lado, se ha reportado que la proteína C/EBP β participa en la neuritogénesis [174] y en la maduración [175,176] y diferenciación neuronales [177]. En ratones OK se observó que los animales presentan un menor número de células en proliferación en la zona subgranular del giro dentado del hipocampo y esto coincide con una menor supervivencia y diferenciación de

las mismas [178]. Además, se ha observado que juega un papel importante en la neuroprotección donde las isoformas LAP promueven la supervivencia ante un estímulo de muerte como la privación de potasio o el tratamiento con ácido kainico [166,179].

En procesos patológicos como el daño neuronal, las enfermedades degenerativas y el cáncer, la expresión de C/EBP β se encuentra alterada. En modelos de daño neuronal como isquemia y daño traumático, la expresión de C/EBP β está aumentada [180,181]. En ratones KO para C/EBP β el daño inducido por una lesión isquémica se reduce y se observan menores deficiencias neurológicas, indicando una importante contribución en la regulación de procesos de inflamación y muerte neuronal [180]. En pacientes con Alzheimer se determinó por estudios de microarreglos que C/EBP β se encuentra sobre-expresado y posteriormente se corroboró por inmunohistoquímica que se encuentra expresado principalmente en la microglía [182,183]. También, en pacientes con esclerosis múltiple, el factor C/EBP β se encuentra entre los principales reguladores de la expresión de genes relacionados con la enfermedad [184]. En cultivos derivados de glioblastomas humanos se determinó que la expresión de C/EBP β y STAT3 correlacionan con una diferenciación mesenquimal y un mal pronóstico. De hecho, la capacidad tumorigénica de la línea celular SNB19 derivada de un glioblastoma humano se inhibe al silenciar a C/EBP β y STAT3 [185]. En biopsias de astrocitomas se determinó que C/EBP β incrementa su expresión de acuerdo al grado de evolución del tumor, pues la expresión tanto del mRNA como de la proteína se encuentra incrementada en biopsias de astrocitomas de alto grado de malignidad (III y IV) en comparación con los de bajo grado de evolución (I y II). Además, el silenciamiento *in vitro* de C/EBP β con RNAs de interferencia disminuye la proliferación e invasión de líneas celulares derivadas de astrocitomas humanos [186]. En células de

glioblastoma murino, el silenciamiento de C/EBP β inhibe la proliferación de las células, induce un arresto en la fase G0/G1 y disminuye su capacidad de transformación y migración. En un modelo ortotópico, la depleción de C/EBP β provoca un retraso en el surgimiento del tumor e incrementa la vida de los animales [187]. Estos datos sugieren que C/EBP β juega un papel importante en la regulación de procesos de inflamación así como en la proliferación y desdiferenciación de las células cancerígenas.

2.5.3. C/EBP β y receptores a hormonas esteroideas

La familia de factores de transcripción C/EBP puede interactuar con distintos receptores nucleares como son RG, RA, RP y RE [66,188–190]. En particular, C/EBP β puede interactuar con el RP, RE y RG formando complejos de transactivación para inducir la expresión génica [66,188,189]. En células de neuroblastoma humano, el receptor RG interactúa con C/EBP β para inducir la expresión del gen del transportador de norepinefrina en presencia de dexametasona [191]. En células epiteliales de mama de ratón, el RP induce la transcripción del gen del receptor a prolactina (RPr1) mediante la interacción con los factores Sp1 y C/EBP β . En este modelo, la isoforma RP-A induce la expresión de RPr1 en ausencia de ligando, mientras que RP-B requiere de P4 para inducir su expresión [66]. En células estromales de endometrio humano, tanto RP-A como RP-B son capaces de interactuar con las tres isoformas de C/EBP β . En estas células, RP-B unido a su ligando interactúa con LIP para inducir la transcripción de genes con ERPs en su región promotora. En cambio, RP-A interactúa con LAP para inducir la expresión de genes con elementos de respuesta para C/EBP β , lo que sugiere que la tasa de expresión de las isoformas de ambos factores de transcripción es importante para determinar la respuesta

celular a la P4 [192]. En la línea celular de cáncer de mama MCF-7, RE α induce la expresión del gen de RPr1 mediante la interacción de su dominio DBD con las proteínas Sp1 y C/EBP β que se encuentran unidas al DNA, inducción que se pierde al tratar a las células con el antagonista del receptor ICI 182 780. Los sitios de unión a Sp1 y C/EBP β son fundamentales para la inducción por E2, aunque al parecer no existe una interacción directa entre Sp1 y C/EBP β a pesar de que los sitios de unión se encuentran separados por aproximadamente 5 pb. Sp1 se encuentra unido al promotor induciendo una expresión basal, pero al tratar con E2, el RE se une a C/EBP β generando un puente de unión con Sp1. Además de la asociación con esta proteína, el RE α recluta coactivadores como SRC-1 y p300 así como a la maquinaria basal de la transcripción para inducir la expresión del RPr1 [189].

También, en tejidos blancos a hormonas esteroideas se ha observado una correlación entre la expresión de C/EBP β , RP y RE [129,193]. En ratones con deleciones germinales en C/EBP β el desarrollo de la glándula mamaria se encuentra alterado. En estos animales, la proliferación de las células inducida por hormonas se reduce, pero se observa un incremento en el número de células positivas para los receptores RE α , RP y RPr1 [129,193,194]. La disminución en la proliferación ocurre debido a un incremento en la actividad de TGF- β , un potente inhibidor de la proliferación, pero también se observó una disminución en la expresión de la cadherina E y un aumento en la expresión y estabilidad de p27, lo cual correlacionó con una pérdida en la actividad de la cinasa cdk2 y por lo tanto un bloqueo en la transición de la fase G1/S del ciclo celular. Estos cambios previenen a las células epiteliales C/EBP β nulas de responder a las señales proliferativas dadas por las hormonas [194]. En ratones, C/EBP β juega un papel importante en el desarrollo

lobuloalveolar y ductal de la glándula mamaria y la distribución espacial de la expresión del RP es fundamental para la proliferación y diferenciación celulares inducida por hormonas sexuales [129,146]. En ratones KO para C/EBP β se observó un incremento en la expresión del RP en la glándula mamaria mas no en el útero, lo que apunta a una regulación tejido específica [129,193]. Además, en ratones KO para las isoformas del RP se reportó que RP-B es fundamental para el desarrollo de la glándula mamaria, mientras que RP-A participa en procesos de ovulación [80,81], lo que abre la posibilidad de que C/EBP β participe en la regulación diferencial de las isoformas del receptor. Por lo tanto, evaluar la participación de otros posibles factores de transcripción, además del RE α , en la regulación de la expresión de las isoformas del RP es fundamental para el estudio del cáncer, en particular de los glioblastomas.

III. Planteamiento del problema

En astrocitomas, la expresión del RP se correlaciona directamente con el grado de evolución del tumor y en glioblastomas la isoforma predominante es RP-B. Por otro lado, C/EBP β juega un papel importante en la regulación de diferentes procesos patológicos, como el cáncer y es capaz de interactuar con el RP. Sin embargo, se desconoce si el factor de transcripción C/EBP β participa en la regulación de la expresión de las isoformas del RP en glioblastomas humanos.

IV. Hipótesis

Si el factor de transcripción C/EBP β participa en la inducción de la expresión de las isoformas del RP, entonces su inhibición modificará la expresión de dichas isoformas así como la regulación mediada por estrógenos.

V. Objetivos

Objetivo general

Determinar la participación del factor de transcripción C/EBP β en la regulación de la expresión de las isoformas del RP en líneas celulares derivadas de glioblastomas humanos.

Objetivos particulares

- Analizar la región promotora del gen del RP para determinar la presencia de probables sitios de unión a los factores de transcripción C/EBP.
- Determinar la expresión de las isoformas del RP y de C/EBP β en líneas celulares derivadas de glioblastomas humanos U251-MG, D54 y U87-MG.
- Evaluar si el factor C/EBP β se une al promotor del RP en células U251-MG.
- Estudiar el efecto del silenciamiento de C/EBP β sobre la expresión del RP en las células U87-MG y U251-MG.
- Estudiar el efecto del silenciamiento de C/EBP β en la regulación del RP mediada por estradiol.
- Evaluar la expresión de genes blanco de la P4 en células con C/EBP β silenciado.

VII. Metodología

6.1. Análisis *in silico*

Para el análisis *in silico* se estudió la región promotora del gen del RP (10113074 a 101128441 pb) el cual se encuentra localizado en el cromosoma 11q22-q23. La secuencia se obtuvo de la base de datos NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5241>) y se determinó la región promotora de acuerdo con lo reportado por Kastner et al., (1990). La secuencia se analizó para predecir posibles sitios de unión de factores de transcripción de la familia C/EBP mediante las bases de datos JASPAR (<http://jaspar.genereg.net/>) [195] y TRANSFAC versión pública 6.0 (<http://www.gene-regulation.com/index2>), así como la herramienta MatInspector de la plataforma Genomatix Software GmbH (<https://www.genomatix.de/>) [196]. Se consideraron como positivos los sitios de unión que tuvieran un valor mayor a 0.80 en la matriz de similitud y que fueran predichos al menos por dos de los tres programas utilizados.

6.2. Cultivo de líneas celulares y tratamientos hormonales

Las líneas celulares derivadas de glioblastomas humanos U251-MG, D54 y U87-MG y las células embrionarias de riñón humano 293 (HEK293) (U251-MG, U87-MG y HEK293 fueron obtenidas del ATCC, USA; D54 fue donada al Dr. Andrés Gutiérrez por el Dr. Sontheimer, Birmingham) se crecieron en medio DMEM (In vitro, S.A., MEX) mientras que las células de cáncer de mama T47D (ATCC, USA) se crecieron en medio RPMI (In vitro, S.A., MEX). Ambos medios fueron complementados con suero fetal bovino (SFB) al 10%, 1 mM de piruvato y 0.1 mM de aminoácidos no esenciales (Biowest, USA) y las células se crecieron bajo condiciones estandarizadas de 37 °C y una atmósfera de 95% de

aire y 5% de CO₂. Para los tratamientos, las células U251-MG infectadas con lentivirus se crecieron en cajas de 6 pozos y 24 h antes se les cambió el medio por DMEM sin rojo de fenol complementado con SFB libre de hormonas (GeneTex, USA). Después de ese tiempo se trataron con ciclodextrina como vehículo (0.02%), P4 (10 nM) por 6 h y estradiol (E2, 10 nM) por 24 h. Las células empleadas para realizar los ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) se trataron con E2 (10 nM) por 3, 6, 9, 12, 24 y 48 h. Las hormonas y la ciclodextrina fueron adquiridas de Sigma-Aldrich (USA).

6.3. Extracción de proteínas y Western Blot

Las células se cultivaron bajo las condiciones descritas anteriormente y se homogenizaron con buffer de lisis RIPA (50 mM Tris HCL, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.1% SDS) complementado con un coctel de inhibidores de proteasas (p8340, Sigma-Aldrich, USA). La proteína total se obtuvo por centrifugación a 14,000 g a 4 °C por 15 min y se cuantificó en el espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, USA). Para estudiar el contenido de las isoformas de C/EBP β y RP se tomaron 70 μ g de proteínas totales y se separaron en un gel desnaturalizante SDS-PAGE al 12% (para C/EBP β) o al 7.5% (para RP) a 80 V. Las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (Millipore, USA) durante 1 h para C/EBP β y 7 h para RP a 35 mA en una cámara semi húmeda a temperatura ambiente. Las membranas se incubaron con una solución de bloqueo al 3% de leche libre de grasa y 1% de albúmina sérica bovina (In vitro, S.A., México) durante 2 h a 37 °C en agitación constante. Para la detección de las isoformas de C/EBP β se utilizó un anticuerpo primario (monoclonal de conejo, ab32358, Abcam, UK) a una concentración de 0.6 μ g/mL y para las dos isoformas del RP se utilizó un anticuerpo

primario (monoclonal de ratón, ab58565, Abcam, UK) a una concentración de 3.3 µg/mL. En ambos casos se incubaron las membranas durante 48 h a 4 °C, se lavaron con TBS-Tween y se incubaron con los respectivos anticuerpos secundarios anti-conejo (1:7500) y anti-ratón (1:5000) acoplados a la peroxidasa de rábano (Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA) durante 45 min a temperatura ambiente y en agitación constante. Las proteínas se identificaron mediante quimioluminiscencia con el sustrato para la peroxidasa Supersignal West Femto (Thermo Scientific, USA) y se revelaron por autoradiografía (BioMax Light Film, Kodak).

Para corregir las posibles diferencias en la proteína cargada se utilizó a la proteína α -tubulina como control. La membrana se incubó en una solución de glicina ácida (0.1 M, pH 2.5) durante 1 hora a temperatura ambiente, se lavó con TBS y se incubó con 0.2 µg/mL de un anticuerpo monoclonal de ratón contra α -tubulina (sc-5286, Santa Cruz Biotechnology, USA) durante 12 h a 4 °C. Después se incubó la membrana con un anticuerpo secundario anti-ratón (1:5000, Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA) durante 45 min a temperatura ambiente para luego revelar la membrana por autoradiografía. Las imágenes fueron tomadas con una cámara Canon digital de 14.1 megapíxeles (SD1400IS, Canon, MEX) y se analizaron con el programa ImageJ 1.45S (National Institutes of Health, USA).

6.4. Extracción de RNA y RT-qPCR

Para la extracción del RNA total las células se lisaron con una solución de isotiocianato de guanidina, se purificó de acuerdo a las instrucciones del RNAeasy Mini Kit (Qiagen, Alemania) y se cuantificó en el espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, USA). Se utilizó 1 µg de RNA total para la síntesis de cDNA utilizando la enzima transcriptasa reversa M-MLV (Invitrogen, USA) y oligo dT₁₈ de acuerdo al protocolo

recomendado: 20 μ L de reacción fueron incubados durante 50 min a 37 °C y después durante 15 min a 70 °C para inactivar la reacción. A partir del cDNA obtenido se hizo un PCR en tiempo real (qPCR) con oligonucleótidos diseñados para amplificar diferentes genes (**Tabla 2**). Se utilizaron 2 μ L de cDNA para una reacción de 20 μ L del qPCR que se realizó en el equipo LightCycler 1.5 (Roche, CH) utilizando el kit LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I (versión 18, Roche, CH). La reacción se llevó a cabo de acuerdo al protocolo sugerido por el proveedor: una desnaturalización a 95 °C por 10 min, 45 ciclos de 10 s a 95 °C, 10 s a 60 °C y 10 s a 72 °C, y una fase de inactivación a 40 °C por 30 s. Se incluyó en cada reacción un control negativo en el cual se omitió la adición de la muestra de cDNA.

Tabla 2. Los primers diseñados para amplificar diversos genes por RT-qPCR

Gen	Primers	Fragmento (pb)
C/EBP β	FW: 5'-ACAGCGACGAGTACAAGATCC-3' RV: 5'-GCAGCTGCTTGAACAAGTTCC-3'	195
RP total (RP-A+RP-B)	FW: 5'-ACATGGTAGCTGTGGGAAGG-3' RV: 5'-GCTAAGCCAGCAAGAAATGG-3'	202
RP-B	FW: 5'-TGTTGTATTTGTGCGTGTGG-3' RV: 5'-ACCTCTCGGTACAGCCCATT-3'	192
VAP-1	FW: 5'-CAGGGGACACTGAACCTTGT-3' RV: 5'-CCTTTCCAGCTCAGCTATGG-3'	233
Ciclina D1	FW: 5'-TGCATAACCCTGAGCGGTGG-3' RV: 5'-TCTCCCGAGACGCCTCCTTT-3'	146
EGFR	FW: 5'-GCCTTGACTGAGGACAGCAT-3' RV: 5'-TGGTAGTGTGGGTCTCTGCT-3'	152
18S	FW: 5'-CGCGGTTCTATTTTGTGGT-3' RV: 5'-GTCGGCATCGTTTATGGTC-3'	218

Nota: FW= primer sentido, RV = primer antisentido

6.5. Inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP)

Las células U251-MG se crecieron en cajas de 10 cm hasta obtener una confluencia del 80-90% y se realizó el entrecruzamiento entre DNA y proteínas con formaldehído al 1% por 10 min en agitación oscilatoria. Las muestras se incubaron con 0.125 M de glicina durante 5 min para inhibir la reacción de entrecruzamiento, se lavaron con PBS frío con PMSF (1 mM) y se colectaron las células. El pellet celular se incubó con 1 mL de buffer de lisis (50 mM Tris pH 8.0, 1% SDS, 10 mM EDTA) con inhibidores de proteasas (p8340, Sigma-Aldrich, USA) y se sonicó con un procesador ultrasónico (micropunta de 2 mm de diámetro, GEX 130; CTR Scientific, MEX) durante 2.5 min con pulsos de una amplitud del 75% y de 10 s de duración seguido de pausas de 30 s para obtener fragmentos de 500 a 1000 pb. El lisado celular se centrifugó a 9,000 g por 10 min a 4 °C, y el sobrenadante se diluyó 10 veces con el buffer de dilución (16.7 mM Tris-HCL pH 8.0, 167 mM NaCl, 1.2 mM EDTA, 1.1% Triton X-100, 0.01% SDS). El 1% de la muestra se tomó como el DNA de entrada (Input) y el resto se incubó durante 12 h a 4 °C con 2-4 µg/mL de los siguientes anticuerpos policlonales: C/EBPβ (sc-150), Sp1 (sc-14027) and REα (sc-7207; Santa Cruz Biotechnology, USA). En cada experimento se incluyó como control positivo una inmunoprecipitación contra la histona H3 acetilada (06-599, Millipore, USA) y como control negativo se usaron muestras sin anticuerpo. Los complejos antígeno-anticuerpo-DNA se precipitaron con proteína A/G Plus-agarosa (sc-2003, Santa Cruz Biotechnology, USA) durante 1 hora a 4 °C en agitación, se centrifugaron a 1,000 g por 2 min y se lavaron con 1 mL de buffer bajo en sales, 1 mL de buffer alto en sales, 1 mL of de buffer de LiCl y dos veces con 1 mL de buffer TE. Los inmunocomplejos se eluyeron (1% SDS, 100 mM NaHCO₃) y se incubaron con RNasa A (10 µg/mL; Sigma-Aldrich, USA) por 30 min a 37 °C. Después se revirtió el entrecruzamiento incubando las muestras con Proteinasa K (50

$\mu\text{g/mL}$, Sigma-Aldrich, USA) durante 12 h a 55 °C. El DNA se purificó con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1; Sigma-Aldrich, USA) y se realizó una reacción de qPCR utilizando el kit LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I (versión 18, Roche, CH) como se describió en la sección de “Extracción de RNA y RT-qPCR”. Los primers que se diseñaron para amplificar la región del promotor de RP-B fueron: 5'-AGCCAAATGTCTTCCTCTGTG-3' como sentido y 5'-CCCACACGCACAAATACAAC-5' como antisentido. La señal fluorescente de la amplificación del fragmento (valor de Ct) fue normalizada de acuerdo al valor de Ct obtenido para el DNA de entrada (Input).

6.6. Producción de plásmido lentiviral e infección de células

Dos plásmidos lentivirales fueron obtenidos de la compañía ATCGbio (ATCGbio Life Technologies, CAN). Uno contiene en su secuencia un shRNA contra C/EBP β y el otro es un plásmido control que contiene un shRNA que carece de un mRNA blanco. Los plásmidos tienen las secuencias para generar las proteínas necesarias para la producción del lentivirus. Ambos plásmidos se amplificaron mediante la transformación de células competentes de la cepa *E. coli* K12/mcrB recA13 endA+. Para ello se crecieron las células en medio LB (1 L: 10 g bactotripton, 5 g extracto de levadura, 10 g NaCl, pH 7.5) hasta obtener una densidad óptica (lectura a 600 nm) de 0.5. Las células competentes se incubaron con 2 μg de plásmido durante 30 min a 4 °C y para transformarlas se sometieron a un choque de calor por 60 s a 42 °C. Se dejaron reposar en hielo por 2 min, se les agregaron 300 μl de medio SOC (1 L: 20 g bactotripton, 5 g extracto de levadura, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM glucosa) y se incubaron 1 hora

a 37 °C. Después se dejaron crecer en cajas con LB sólido y ampicilina (50 µg/mL) durante toda la noche a 30 °C. De las colonias que crecieron se seleccionaron un par de ellas y se cultivaron en 2 ml de medio LB durante toda la noche en agitación a 30 °C. De este cultivo se realizaron parches en placas de LB con ampicilina y el resto se utilizó para purificar el plásmido mediante el kit AxyPrep Plasmid Miniprep (Axygen, USA). Una vez purificado se separó en un gel de agarosa al 0.7% para evaluar la presencia del plásmido (10 kb) en las colonias seleccionadas. De las colonias positivas para el plásmido se creció un pre-cultivo (2 ml) durante 4 h en agitación a 30 °C, el cual se utilizó como inóculo para un cultivo mayor de 50 ml. Este cultivo se utilizó para purificar una mayor cantidad de plásmido.

Una vez purificado y cuantificado el plásmido, se utilizaron las células HEK293 para su transfección y producción de lentivirus. Las células HEK293 se crecieron como está descrito en la sección de “Cultivo de líneas celulares y tratamientos”. Para la producción de lentivirus se siguió el protocolo del kit pLenti Lentivirus Production (ATCGbio Life Technology, CAN) en el cual las células HEK293 se sembraron en cajas de 6 pozos previamente tratados con la solución de revestimiento (*coating solution*) proporcionada para una rápida adhesión de las células. Después de 2 h las células se transfectaron con 0.5 µg/mL de plásmido, ya sea plásmido control o con el shRNA contra C/EBPβ. Las células se incubaron por 4 h al cabo de las cuales el medio se cambió por 2 ml de medio específico para la producción de lentivirus (ATCGbio, CAN) y se dejaron toda la noche en incubación a 37 °C. Después se les añadió 1 mL más del medio para la producción de lentivirus y se incubaron por 24 h más. Al tercer día se colectó el medio, el cual contiene las partículas lentivirales, se centrifugó a 9,000 g por 5 min y se filtró por una membrana de PDVF de 0.22 µm (Millipore, USA). Este filtrado viral (100 µL) fue empleado para infectar a las

células U251-MG y U87-MG previamente sembradas en cajas de 6 pozos a una confluencia del 30% con el fin de silenciar a C/EBP β . Las células se crecieron en presencia del lentivirus durante 72 h y durante las últimas 12 h se les agregó higromicina (50 μ g/mL) para iniciar la selección de las células infectadas. Después del tiempo de infección las células con el C/EBP β silenciado se crecieron en medio DMEM con higromicina a 100 μ g/mL y se utilizaron para realizar análisis de Western blot, inmunofluorescencia y RT-qPCR.

6.7. Inmunofluorescencia

La expresión del RP se estudió en las células U251-MG con el C/EBP β silenciado. Las células se crecieron en portaobjetos con 4 cámaras (Lab-Tek II, Thermo Scientific, USA) en medio DMEM sin rojo fenol complementado con SFB al 10% e higromicina (100 μ g/mL). Pasado ese tiempo las células se fijaron por 20 min en una solución de paraformaldehído al 4% en agitación y a temperatura ambiente, se lavaron con PBS y se permeabilizaron con metanol al 100% por 6 min a -20 °C. Las células fijadas se incubaron con una solución de bloqueo (5% suero normal de cabra en PBS-Tween 0.1%) durante 1 h a 37 °C y luego con 2 μ g/mL del anticuerpo policlonal anti-RP (1:500, sc-539, Santa Cruz Biotechnology, USA) durante 12 h a 4 °C y en agitación constante. Después las muestras se lavaron tres veces con PBS por 10 min y se incubaron en oscuridad con el anticuerpo secundario anti-conejo acoplado a FITC (1:500, sc-2012; Santa Cruz Biotechnology, USA) por 2 h a temperatura ambiente. Los núcleos se marcaron con 2 μ g/mL Hoechst 33342 (Thermo Scientific, USA), se montaron con el medio Fluoro Care Anti-Fade Mountant (Biocare Medical, USA) para preservar la fluorescencia y se observaron bajo un

microscopio de fluorescencia Olympus BX43F a un aumento de 600X (Olympus, JPN). Para cada inmunofluorescencia se incluyó como control negativo una muestra donde se omitió el anticuerpo primario. Se tomaron 5 campos aleatorios de cada muestra y se midió la fluorescencia de al menos 15 células por campo con el programa ImageJ 1.45S (National Institutes of Health, USA) para calcular la fluorescencia total corregida (CTCF).

6.8. Análisis estadístico

Todos los datos fueron analizados y graficados con el programa GraphPad Prism 6.0e (GraphPad Software, Inc., USA) utilizando ya sea una ANOVA de una vía (ChIP) o de dos vías (Western blot y RT-qPCR de células tratadas) seguida de una prueba de comparaciones múltiples de Tukey con un intervalo de confianza del 95%. Los resultados de la expresión de C/EBP β en las células infectadas y los valores de CTCF de la inmunofluorescencia fueron analizados con una prueba de *t* de Student independiente. Se consideró como estadísticamente significativo todo aquel valor de $P < 0.05$.

VII. Resultados

7.1. El promotor de RP-B tiene tres potenciales sitios de unión para C/EBP

El gen del RP se regula por E2 en distintos tejidos como el cerebro, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas tales como el cáncer [45,197]. El gen del RP cuenta con ocho exones y dos promotores a partir de los cuales se transcriben las dos isoformas del receptor (**Figura 6A y B**). En astrocitomas humanos, la expresión del RP aumenta conforme el grado de evolución del tumor y RP-B es la isoforma predominante en los tumores de alto

grado de malignidad [3,4], lo que sugiere que existe una regulación diferencial de las isoformas en estos tumores. Una de la familia de factores de transcripción que pueden participar en dicha regulación diferencial es aquella conocida como C/EBP, la cual comprende a seis subtipos. Para analizar la probabilidad de la participación de C/EBP en la regulación de la expresión del RP, se realizó un análisis *in silico* de la región promotora del RP conforme a lo reportado por Kastner et al. (1990). Para ello empleamos diferentes herramientas informáticas (JASPAR, TRANSFAC y MatInspector) para buscar potenciales sitios de unión a C/EBP. El análisis bioinformático arrojó que únicamente en el promotor de RP-B se encuentran tres potenciales sitios de unión a C/EBP (-546 a -532, -218 a -203, and -189 a -177 con respecto al sitio de inicio de la transcripción +1, **Figura 6C**). Los sitios de unión se consideraron como positivos si al menos dos de los tres programas los predecían. De manera interesante, el sitio hacia el extremo 3' (-189 a -177) fue predicho por los tres programas, lo que indica una alta probabilidad de ser un sitio de unión funcional. Cerca de este potencial sitio de unión hay una región que contiene una caja CCAAT conservada y dos sitios de unión a Sp1 (**Figura 6C**), estos últimos se han reportado como importantes para la expresión mediada por E2 en cáncer de mama [6]. La distribución diferencial tan marcada de los sitios de unión para C/EBP nos llevó a estudiar el papel que juegan, en particular el subtipo C/EBP β , en la regulación de la expresión de RP-B en glioblastomas humanos.

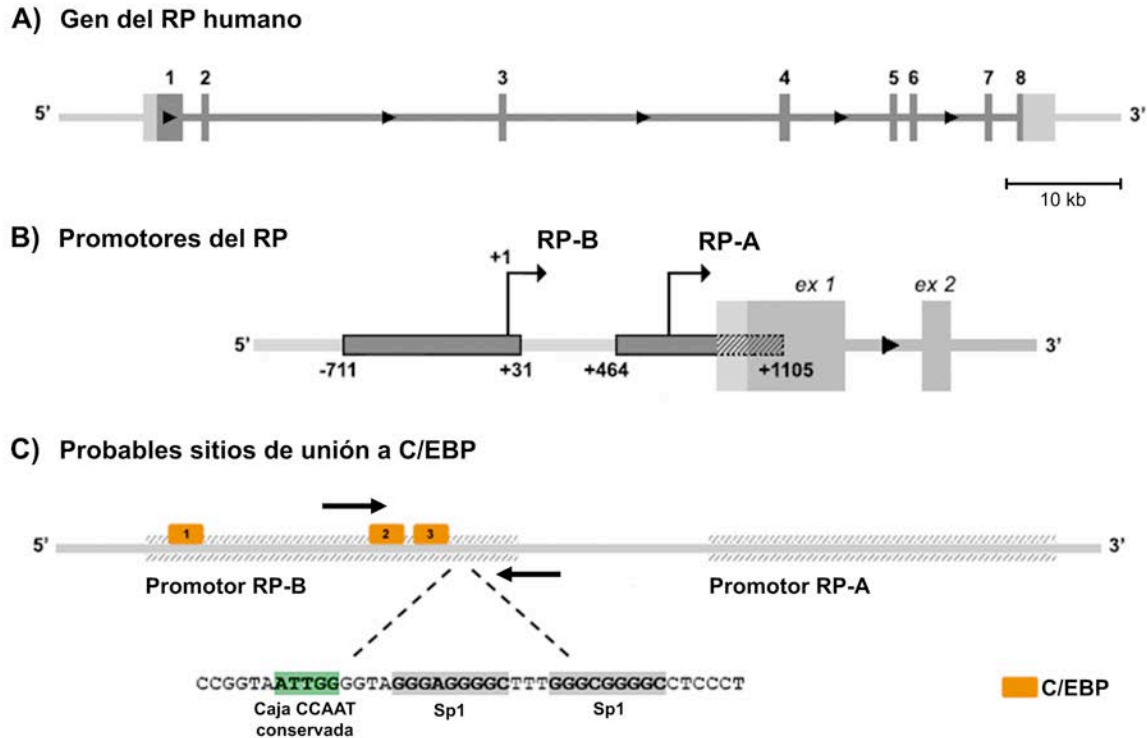


Figura 6. Análisis *in silico* de la región promotora del gen del RP de humano. **A)** Estructura del gen del RP de acuerdo con la base de datos NCBI, sus ocho exones están numerados. **B)** La región promotora del gen del RP de humano en el cual se muestran los dos promotores y sus respectivos sitios de inicio de la transcripción así como la longitud de cada uno de ellos determinada de acuerdo al nucleótido +1 según lo reportado por Kastner et al. (1990). En la figura se muestran los exones (ex) 1 y 2. **C)** Análisis *in silico* de la región promotor del gen del RP para buscar probables sitios de unión para C/EBP utilizando las herramientas bioinformáticas TRANSFAC, JASPAR y MatInspector. Los tres sitios probables se encuentran localizados únicamente en el promotor del RP-B (rectángulos numerados) de los cuales el 2 y el 3 se localizan cerca de una caja CCAAT conservada y dos sitios de unión a Sp1 que se muestran en la secuencia amplificada. Las flechas marcan los sitios de unión de los primers empleados para los ensayos de ChIP.

7.2. Las isoformas del RP y C/EBP β se encuentran diferencialmente expresadas en líneas celulares de glioblastoma

Dado que el factor C/EBP β se encuentra expresado en astrocitos y en diferentes regiones del cerebro de la rata así como en astrocitomas humanos [137,160,186], se buscó caracterizar su expresión, así como la del RP, en las líneas celulares U251-MG, D54 y U87-MG. Para ello se realizó un Western blot a partir del cual se encontró que las líneas celulares muestran un contenido diferente de las isoformas del RP y de C/EBP β . En cuanto a la expresión del RP se encontró que las células U251-MG y las U87-MG expresan en mayor proporción RP-B que RP-A (3:1 y 2:1, respectivamente). En cambio, las células D54 expresan ambas isoformas en una proporción equivalente (1:1) (**Figura 7A**), como se había reportado previamente [46]. La línea celular de cáncer de mama T47D se utilizó como control positivo debido a que expresan altos niveles de las isoformas del receptor, tal como se ha reportado previamente [198]. Con respecto a las isoformas de C/EBP β , las tres líneas celulares muestran un mayor contenido de LAP2 en comparación con las otras dos isoformas (**Figura 7B**). La tasa de expresión de las isoformas, considerada como la suma de la expresión de LAP1 y LAP2 sobre la de LIP (LAP/LIP), es un mejor indicador del papel que juega C/EBP β en dichas células que cada isoforma por separado. Los resultados muestran que U251-MG tiene un mayor contenido de LIP lo que reduce la tasa LAP/LIP a una relación de 2:1, mientras que U87-MG tiene un mayor contenido de LAP1 lo que incrementa la proporción LAP/LIP a una relación de 7:1. Las células D54 muestran una tasa LAP/LIP de 3:1 (**Figura 7B**).

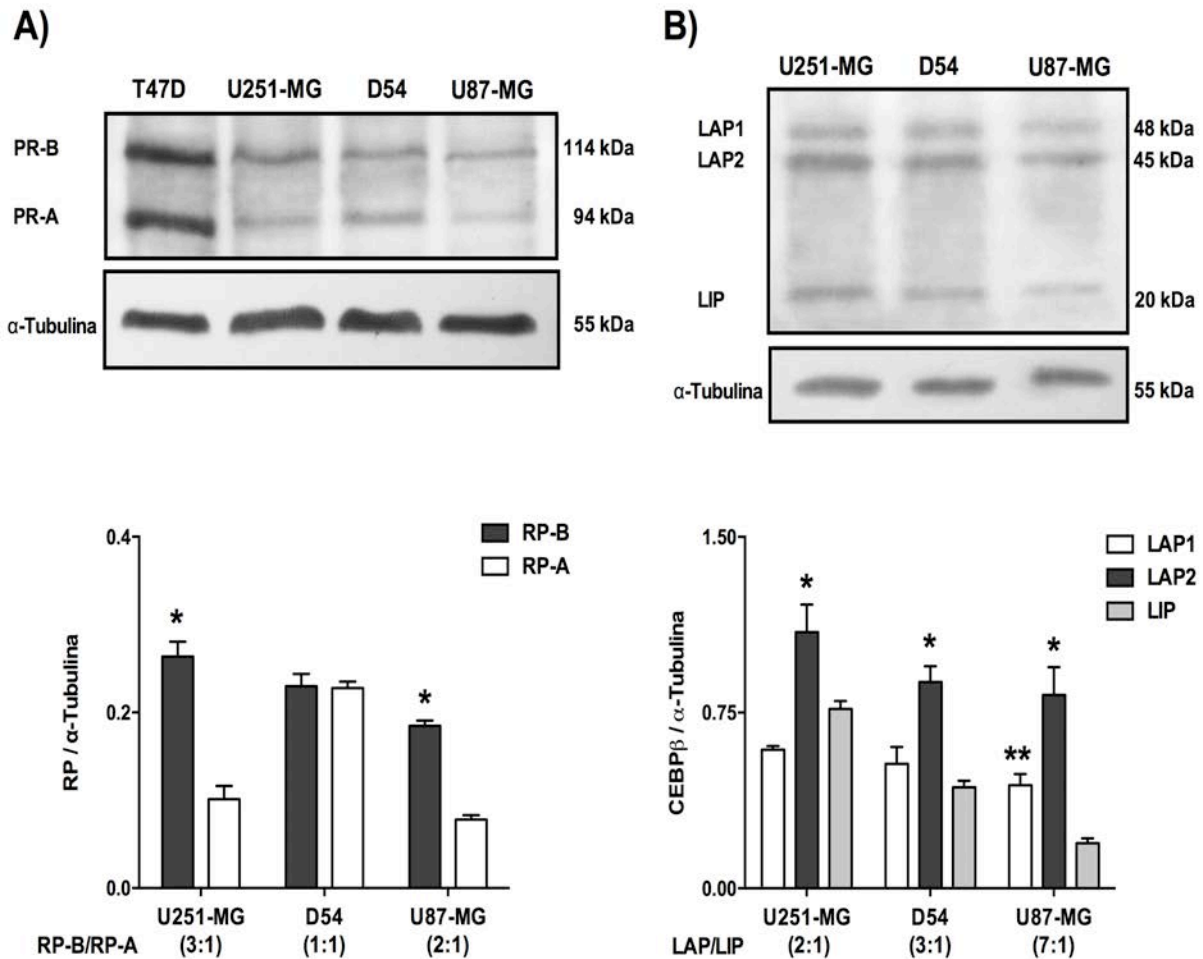


Figura 7. Contenido de las isoformas del RP y de C/EBPβ en líneas celulares de glioblastoma humano. **A)** El contenido de las isoformas del RP se determinó por Western blot en las líneas celulares T47D (control positivo), U251-MG, D54 y U87-MG. **(B)** El contenido de las isoformas de C/EBPβ LAP1, LAP2 y LIP se determinó en las líneas celulares derivadas de glioblastomas. Tanto en **A)** como en **B)** se muestra una imagen representativa del blot así como el análisis densitométrico correspondiente. **A)** * $P < 0.01$ vs. RP-A en U251-MG y U87-MG, se muestra la media \pm E.S.M., $n=5$. **B)** * $P < 0.01$ vs. LAP1 y LIP, ** $P < 0.05$ vs. LIP en U87-MG, se muestra la media \pm E.S.M., $n=3$.

7.3. C/EBP β , Sp1 y RE α se unen al promotor del RP-B

Una vez caracterizada la abundancia de las isoformas del RP y C/EBP β en las líneas celulares derivadas de glioblastoma se analizó si el factor C/EBP β es capaz de unirse a la región promotora del RP-B. La región del promotor que se decidió analizar contiene dos de los sitios de unión a C/EBP β predichos (números 2 y 3, **Figura 6C**), la caja CCAAT conservada y los dos sitios de unión a Sp1 (ver flechas **Figura 6C**). Para ello se escogió la línea celular U251-MG debido a que expresa la isoforma RP-B en mayor proporción que RP-A.

La inmunoprecipitación de las isoformas de C/EBP β se evaluó primero por ChIP-Western blot y como se observa en la **Figura 8A** las tres isoformas son capaces de unirse al DNA. En particular la isoforma LIP se encuentra más enriquecida que las isoformas LAP1 y 2 (**Figura 8A**). Los ensayos de ChIP muestran que C/EBP β se une de forma basal al promotor de RP-B (**Figura 8B**), sin embargo, estos estudios no permiten diferenciar las isoformas de C/EBP β que se encuentran unidas a dicha región. Además de los probables sitios de unión a C/EBP β , en la región estudiada del promotor de RP-B hay dos sitios de unión a Sp1 a través de los cuales RE α induce la expresión mediada por E2 de RP-B [6]. Por dicha razón, se realizaron ensayos de ChIP para evaluar si Sp1 y RE α se encuentran enriquecidos en la región promotora bajo estudio. Los resultados mostraron que Sp1 se une al promotor de RP-B en ausencia de un estímulo hormonal y de manera interesante RE α también se encuentra enriquecido (**Figura 8B**), probablemente debido a una fuerte interacción proteína-proteína con Sp1 como se reportó en la línea celular MCF-7 [6]. Debido a esto se realizaron estudios de ChIP-reChIP para evaluar si las proteínas unidas al promotor son capaces de interactuar entre sí, pero los datos no fueron concluyentes. Estos

datos sugieren que en condiciones basales y en ausencia de un estímulo hormonal los tres factores de transcripción se encuentran unidos a la región promotora del RP-B.

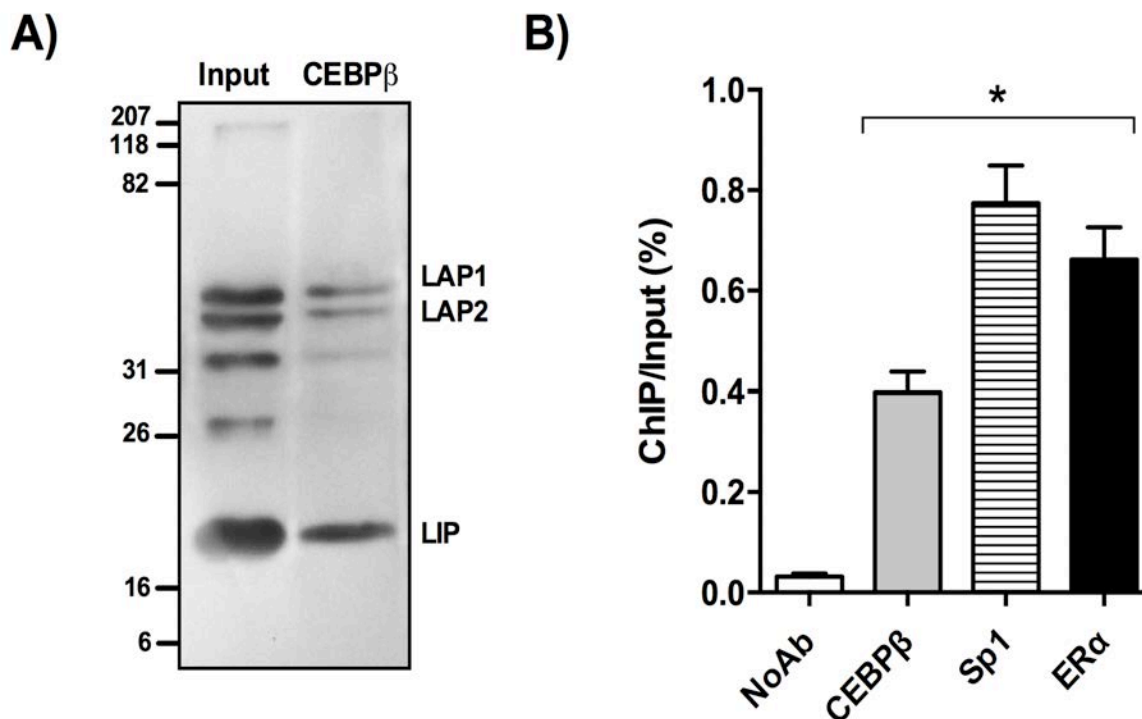


Figura 8. C/EBPβ, Sp1 y REα se unen al promotor de RP-B en las células U251-MG. **A)** ChIP-Western contra C/EBPβ para evaluar la eficiencia del anticuerpo. Las células se trataron con formaldehído al 1%, se inmunoprecipitó la cromatina contra C/EBPβ y se separaron las proteínas por electroforesis SDS-PAGE. La figura muestra una imagen representativa de tres experimentos independientes. **B)** Ensayos de ChIP para el promotor de RP-B y evaluando por qPCR los factores de transcripción C/EBPβ, Sp1 y REα. Los datos muestran el porcentaje del enriquecimiento relativo de cada factor con respecto a su DNA de entrada (ChIP/Input, %). Se muestra también el control negativo de una inmunoprecipitación sin anticuerpo (NoAc) como comparación del enriquecimiento específico respecto al ruido de fondo de la técnica. Los datos representan la media ± E.S.M., n=6.

7.4. C/EBP β regula negativamente la expresión del PR-B en las células U251-MG

Una vez caracterizada la expresión de C/EBP β y de haber estudiado su capacidad de unión al promotor del RP-B, se buscó silenciar a dicho factor para evaluar su función en la regulación de la expresión del gen del RP. Para ello se empleó un plásmido lentiviral que contiene en su secuencia un shRNA dirigido contra C/EBP β . Se amplificó el plásmido transformando células competentes y se transfectó a células HEK293 para la producción de lentivirus. Las células U251-MG y U87-MG, las cuales presentan la tasa LAP/LIP más baja y más alta, respectivamente, fueron infectadas con el fin de silenciar al factor C/EBP β bajo diferentes contextos celulares. Sin embargo, tras 48 h de infección, las células U87-MG mostraron un elevado porcentaje de células muertas ($\approx 90\%$) en comparación con las U251-MG (**Figura 9**). Debido a esto, dichas células no pudieron ser utilizadas para estudiar el efecto del silenciamiento de C/EBP β sobre la expresión del RP.

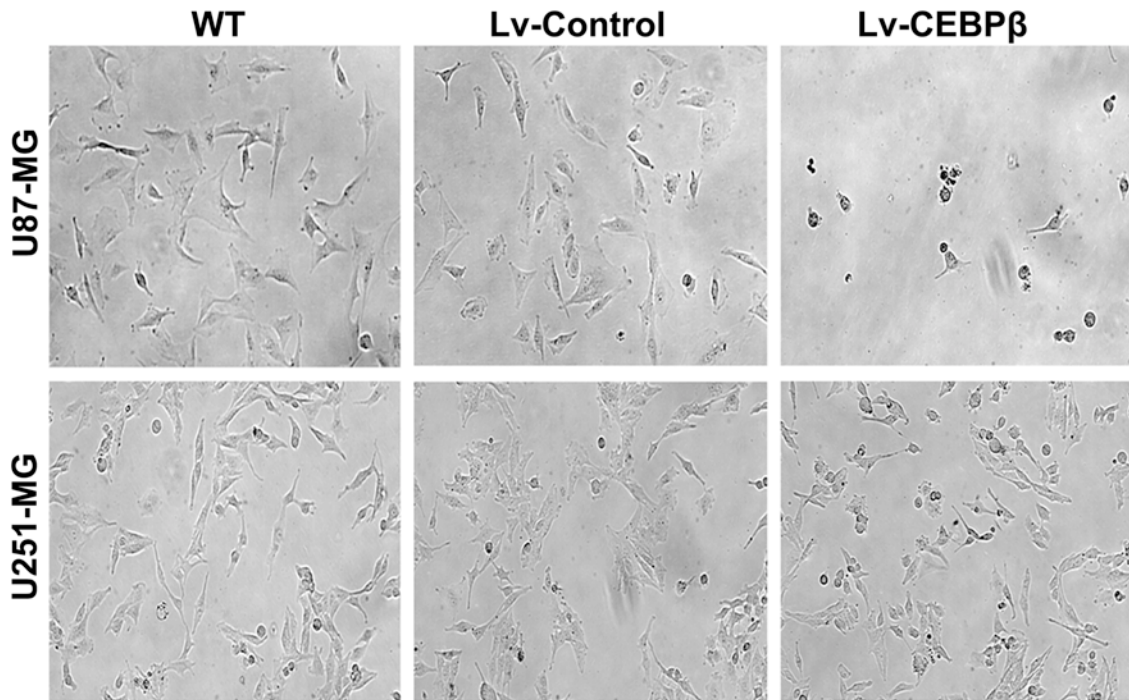


Figura 9. Células U87-MG y U251-MG infectadas con lentivirus. Las células se infectaron con un lentivirus Lv-Control y Lv-CEBP β y 48 h después se evaluó cualitativamente la calidad del cultivo. Se incluyeron células sin infectar como control positivo (WT). La figura muestra imágenes representativas de tres campos tomados de forma aleatoria para cada condición de dos experimentos independientes.

A partir de las células U251-MG infectadas se extrajeron RNA y proteínas totales para corroborar el nivel de silenciamiento del C/EBP β . En la **Figura 10A** se puede observar que a nivel del mRNA el factor C/EBP β se silenció en un 60% aproximadamente, mientras que a nivel de la proteína el contenido de las tres isoformas, evaluado por densitometría de tres experimentos independientes, se redujo entre un 61 y 75% de las cuales LIP es la isoforma más afectada (**Figura 10A**).

Una vez evaluado del nivel de silenciamiento del C/EBP β , se estudió la expresión del RP, tanto por RT-qPCR como por Western Blot. De manera interesante se encontró que en las células con el factor C/EBP β silenciado, la expresión del RP total (RP-AB) y la de RP-B

aumentó con respecto a aquellas que fueron infectadas con un lentivirus control. Dicho aumento se debe principalmente a RP-B y no a RP-A (**Figura 10B**). Este aumento se observó también a nivel de la proteína en el que únicamente la isoforma RP-B incrementa significativamente (1.5 veces) en ausencia de C/EBP β , mientras que el contenido de la isoforma RP-A muestra una ligera tendencia a aumentar, pero no es estadísticamente significativa (**Figura 10C**).

Para corroborar los datos se realizaron inmunofluorescencias para detectar al RP en células U251-MG infectadas. La localización del RP se observó tanto a nivel del citoplasma como del núcleo de las células (**Figura 10D**) tal como se había reportado previamente en otras líneas celulares derivadas de astrocitomas humanos [98]. De acuerdo a los valores de la fluorescencia total corregida (CTCF) calculados en las células silenciadas se observó un aumento significativo en la expresión del RP en comparación con las células control (Lv-Control) (**Figura 10D**). Estos resultados indican que C/EBP β participa en la regulación negativa de la expresión de RP-B.

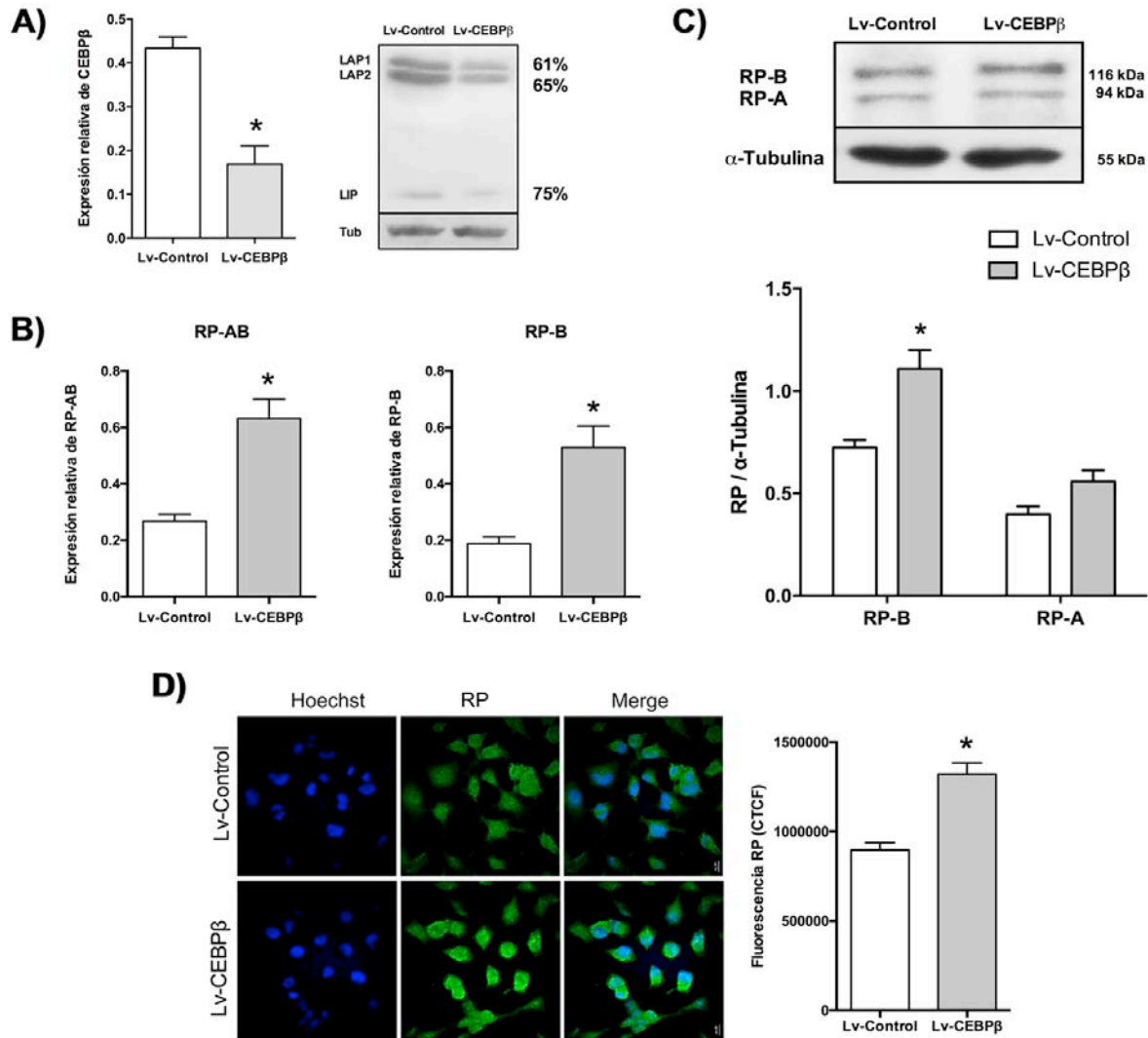


Figura 10. El silenciamiento del factor C/EBP β induce la expresión del RP-B en las células U251-MG. Las células fueron infectadas con un lentivirus portador de un shRNA contra C/EBP β (Lv-CEBP β) y un shRNA control (Lv-Control) durante 72 h y se obtuvieron muestras de RNA y proteína. **A)** Expresión de C/EBP β a nivel de mRNA y de proteína tras el silenciamiento, * $P < 0.01$ vs. Lv-Control, la media \pm E.S.M., $n = 5$. **B)** RT-qPCR para RP total (RP-AB) y RP-B en las células U251-MG, * $P < 0.01$ vs. Lv-Control, la media \pm E.S.M., $n = 4$. **C)** Western blot para las isoformas del RP en células infectadas, * $P < 0.001$ vs. Lv-Control, la media \pm E.S.M., $n = 3$. **D)** Inmunofluorescencia para detectar al RP en células U251-MG con C/EBP β silenciado. Los núcleos están marcados en azul con Hoechst 33342 y el RP en verde (FITC), se muestra también la imagen del sobrelape (merge). La fluorescencia total corregida (CTCF) se obtuvo midiendo la fluorescencia de al menos 15 células por cada uno de los 5 campos aleatorios tomados para cada condición. * $P < 0.001$ vs. Lv-Control, la media \pm E.S.M., $n = 2$.

7.5. La regulación negativa de la expresión del RP mediada por C/EBP β es modulada por E2

C/EBP β se une al promotor de RP-B y regula negativamente la expresión de este receptor en las células U251-MG. De acuerdo con lo reportado, E2 induce la expresión del RP a través del RE α [45,199] y en particular la expresión del RP-B se regula a través del reclutamiento del RE α por Sp1 [6]. Es por ello que se evaluó el papel de C/EBP β en la regulación de la expresión de RP-B en presencia de E2. Para esto se estudió, mediante ensayos de CHIP, si la unión de C/EBP β al promotor de RP-B se veía afectada ante un estímulo hormonal. Los resultados muestran que la asociación de C/EBP β al promotor se redujo significativamente en presencia de E2 (10 nM) desde las 3 h hasta las 48 h en comparación con el vehículo (V) (**Figura 11A**) lo que sugiere que la disociación de C/EBP β del promotor de RP-B es importante para la regulación dependiente de E2. Para ahondar más en la regulación negativa por C/EBP β , se estudió la expresión del RP en células infectadas con lentivirus y tratadas con E2 por 24 h. Los resultados muestran que en las células infectadas con Lv-Control, el tratamiento con E2 induce la expresión del RP-AB y RP-B de acuerdo con lo reportado (**Figura 11B**). El silenciamiento de C/EBP β incrementa la expresión basal del RP de acuerdo con lo obtenido en los resultados previos y el tratamiento con E2 aumenta significativamente la expresión de RP-AB y RP-B, aunque la proporción de dicho aumento no fue mayor a la observada en la condición control (**Figura 11B**). También se evaluó el nivel de expresión de C/EBP β bajo un estímulo hormonal en las células U251-MG infectadas y se encontró que este factor es inducido por el tratamiento con E2 en la condición control, mientras que en las células con C/EBP β

silenciado se pierde dicha inducción (**Figura 11C**). Estos resultados sugieren que C/EBP β actúa como un represor de la expresión de RP-B y que su ausencia del promotor es importante para la inducción dependiente de E2.

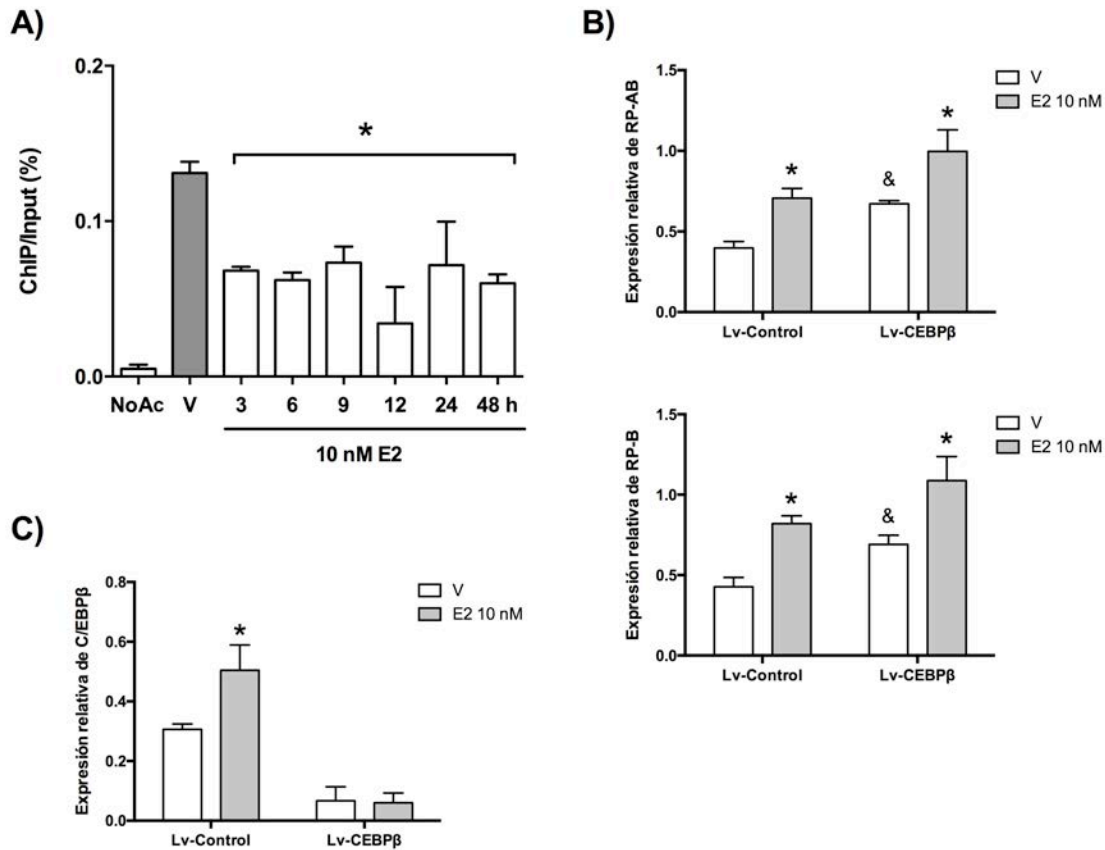


Figura 11. El E2 regula la unión de C/EBP β a la región promotora de RP-B y la expresión del RP-AB y RP-B en las células U251-MG. **A)** Ensayo de ChIP para C/EBP β en células U251-MG tratadas con vehículo (V, ciclodextrina 0.02%) y 10 nM de estradiol (E2) por 3, 6, 9, 12, 24 y 48 h. Se realizó el entrecruzamiento con formaldehído al 1% y se amplificó la región de interés del promotor de RP-B por qPCR. Los datos muestran el porcentaje del enriquecimiento relativo con respecto al DNA de entrada (ChIP/Input, %) de las células tratadas con V y E2. Se muestra también el control negativo de una inmunoprecipitación sin anticuerpo (NoAc) como comparación del enriquecimiento específico respecto al ruido de fondo de la técnica. * $P < 0.01$ vs. V, la media \pm E.S.M., $n = 3$. **B)** RT-qPCR de RP-AB y RP-B en células con C/EBP β silenciado y tratadas con E2 (10 nM, 24 h). * $P < 0.01$ vs. V, se muestra la media \pm E.S.M., $n = 4$; & $P < 0.05$ vs. V Lv-Control, la media \pm E.S.M., $n = 4$. **C)** RT-qPCR para C/EBP β en células U251-MG con C/EBP β silenciado y tratadas con E2 por 24 h. * $P < 0.01$ vs. V, la media \pm E.S.M., $n = 3$.

7.6. La progesterona regula genes blanco en células con C/EBP β silenciado

El silenciamiento de C/EBP β incrementa la expresión del RP-B, por lo que se evaluó la función de este receptor en las células U251-MG infectadas midiendo el nivel de expresión de genes blancos de la progesterona (P4) como son la ciclina D1, EGFR y la proteína de adhesión vascular 1 (VAP-1) [41,200]. Las células U251-MG con C/EBP β silenciado fueron tratadas con P4 (10 nM) por 6 h y se evaluó la expresión de ciclina D1, EGFR y VAP-1 por RT-qPCR. En las células Lv-Control, la expresión de los tres genes aumentó significativamente después del tratamiento con P4 en comparación con el vehículo, corroborando así su expresión dependiente de P4 (**Figura 12**). El silenciamiento de C/EBP β incrementó de forma basal la expresión de ciclina D1 y EGFR en comparación con las células Lv-Control. Sin embargo, el tratamiento con P4 no modificó la expresión de ciclina D1 y la de EGFR disminuyó significativamente en comparación con el vehículo (**Figura 12A y B**). De manera interesante, la expresión de VAP-1 de las células Lv-CEBP β tratadas con vehículo mostró una tendencia a incrementar en comparación con las células Lv-Control y se mantuvo la inducción dependiente de P4 (**Figura 12C**).

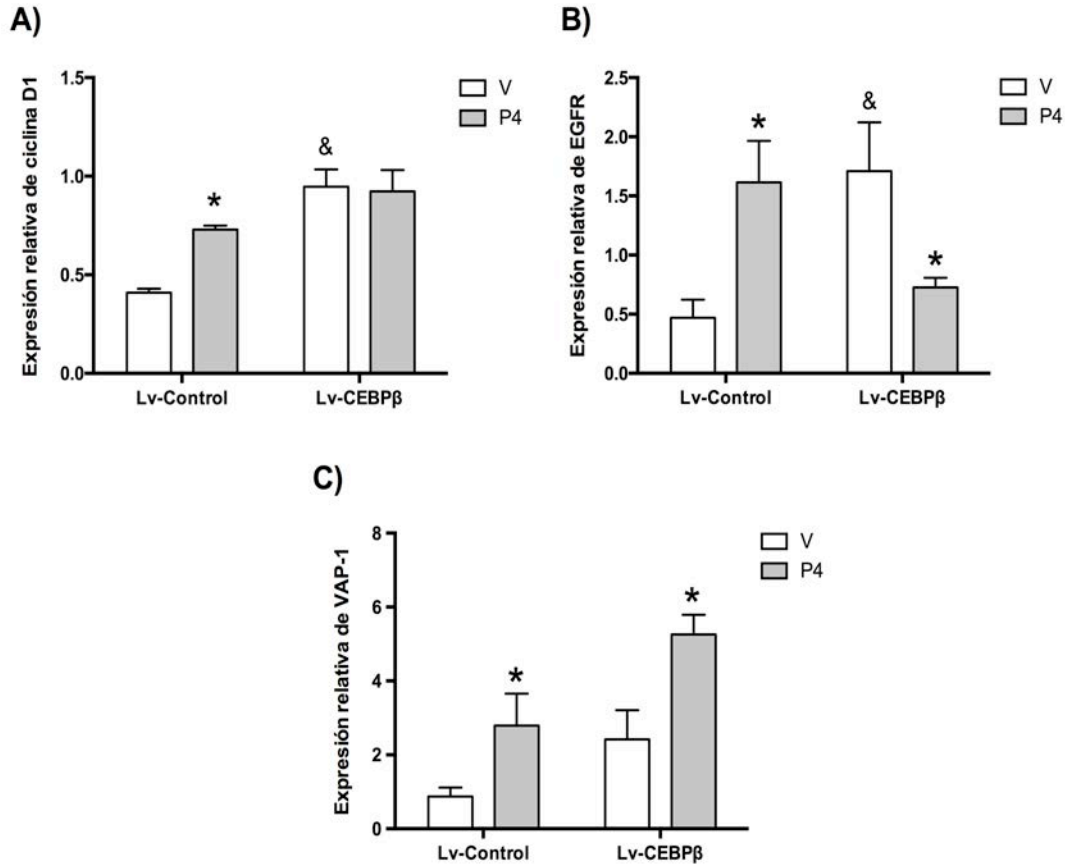


Figura 12. La P4 regula específicamente la expresión de distintos genes blanco en células U251-MG con C/EBP β silenciado. Las células infectadas con un lentivirus control (Lv-Control) y uno contra C/EBP β (Lv-CEBP β) fueron tratadas con P4 (10 nM) y con vehículo (ciclodextrina 0.02%) por 6 h. Se realizó RT-qPCR de genes blanco de la P4 como ciclina D1 (A), EGFR (B) y VAP-1 (C). A) * $P < 0.001$ vs. V, B) * $P < 0.01$ vs. V y C) * $P < 0.05$ vs. V, se muestra la media \pm E.S.M, $n=3$. Se observó una diferencia significativa entre las células tratadas con vehículo de Lv-CEBP β con respecto a Lv-Control, & $P < 0.05$, la media \pm E.S.M, $n=3$.

VIII. Discusión

En este trabajo se evaluó el papel del factor de transcripción C/EBP β en la regulación de la expresión de RP-B en células de glioblastoma humano. En estudios previos se reportó la interacción entre C/EBP β y el RP, pues se sabe que el RP puede inducir la expresión de

C/EBP β en células epiteliales uterinas de ratón [201] y que en células estromales de endometrio humano RP-A interactúa con LAP para regular la expresión de genes blanco de C/EBP β mientras que RP-B interactúa con LIP para regular la expresión de genes blanco del RP [192]. Además, se ha reportado que C/EBP β es capaz de unirse al segundo intrón del gen del RP [128], pero se desconoce si este factor juega un papel en la regulación de la expresión de este receptor. Como una primera aproximación para contestar esta pregunta se realizó un análisis *in silico* de la región promotora del gen del RP el cual arrojó que únicamente el promotor de RP-B tiene tres probables sitios de unión a los factores de transcripción de la familia de C/EBP. Aunque que se analizó la región promotora del gen para evaluar la presencia de los sitios de unión para todos los miembros de la familia C/EBP, nos enfocamos únicamente en estudiar la participación de C/EBP β en la regulación de la expresión del RP debido a los estudios reportados acerca de su interacción [128,192,201].

En los astrocitomas humanos, la expresión del RP es directamente proporcional al grado de evolución del tumor y la isoforma predominante en los tumores de alto grado de malignidad es RP-B [3,4]. De acuerdo con los datos obtenidos se puede observar que todas las líneas celulares estudiadas expresan las isoformas del RP. En las células U251-MG y U87-MG hay un mayor contenido de RP-B que de RP-A, por lo que representan un buen modelo para el estudio de la regulación de la expresión de las isoformas de este receptor. Asimismo, el factor de transcripción C/EBP β se expresa en todas las líneas celulares y la isoforma LAP2 se expresa en mayor proporción que las isoformas LAP1 y LIP. LAP2 se considera la isoforma transcripcionalmente más activa [138] y en cáncer de mama se ha reportado que se encuentra sobre-expresada o participa en la regulación de la expresión de

genes importantes para la proliferación y migración celular [148,150,202]. Debido a la regulación a nivel traduccional de la expresión de las isoformas del C/EBP β , la tasa LAP/LIP puede variar de acuerdo con el contexto celular y se ha reportado que esto puede ser relevante para el desarrollo y progresión del cáncer [141,156,203]. Las alteraciones en la expresión de LIP se han asociado a una mayor susceptibilidad a la tumorigenesis y de hecho, en cáncer de mama se reportó que el incremento en la expresión de LIP puede antagonizar a LAP2 como mecanismo de evasión del efecto inhibitorio del crecimiento celular inducido por TGF β [204]. En las líneas celulares estudiadas las distintas tasas de LAP/LIP observadas sugieren variaciones en la regulación traduccional del C/EBP β y por tanto en la regulación de la expresión de genes blanco.

La región promotora de RP-B escogida para los ensayos de ChIP contiene dos de los tres sitios de unión predichos para C/EBP, los cuales se encuentran cercanos a la caja CCAAT conservada y a los sitios de unión a Sp1. De acuerdo con los resultados obtenidos, C/EBP β se une de forma basal al promotor de RP-B. Se sabe que este factor se puede unir a la regiones promotoras e intrónicas de diversos genes que se expresan típicamente en las neuronas, lo cual sugiere que juega un papel importante en el SNC [158]. En las células de cáncer de mama MCF-7, C/EBP β se une a una caja CCAAT invertida e induce la expresión del gen de resistencia a drogas MDR1 [205], lo que indica que este factor podría también unirse a la caja CCAAT reportada para el promotor de RP-B. Sin embargo, los estudio de ChIP no permiten determinar qué dímero formado entre las isoformas de C/EBP β se encuentra unido al promotor de RP-B ni el sitio particular que reconocen, por lo que se requerirían estudios de reconstitución específica de las isoformas así como análisis de mutagénesis dirigida para evaluar la forma en la que C/EBP β se encuentra unido al promotor de RP-B.

Además de C/EBP β , Sp1 se asocia a la región promotora de RP-B donde se encuentra el sitio -61 Sp1, lo cual ya se había reportado que ocurre ante un estímulo hormonal en líneas celulares de cáncer de mama [6]. La unión de Sp1 al sitio +571 ERE/Sp1 en el promotor de RP-A ocurre de forma basal [5] y en este caso lo observamos también unido al promotor de RP-B en ausencia de un estímulo hormonal. De forma interesante, RE α también se encuentra enriquecido en la región promotora de RP-B, sugiriendo una posible interacción con Sp1 como se ha reportado en las células MCF-7 [6]. Incluso se ha observado una asociación de RE α con Sp1 y C/EBP β como complejo de inducción de la transcripción del gen del RPr1 en donde RE α recluta a C/EBP β al complejo Sp1-DNA para inducir su expresión [189]. No obstante, el tratamiento con E2 promueve la disociación de C/EBP β del promotor de RP-B desde las 3 h hasta las 48 h, lo que sugiere que en este caso la disminución en la unión de C/EBP β puede ser importante para la regulación de la expresión de RP-B mediada por E2. La interacción C/EBP β , Sp1 y RE α debe ser importante para la expresión de RP-B, aunque se requieren estudios empleando construcciones con genes reporteros, de interacción proteína-proteína y de ChIP-reChIP para evaluar el papel que tiene cada uno de los tres factores de transcripción.

C/EBP β juega un papel importante en la supervivencia de las células, pues en un modelo de glioma murino el silenciamiento de este factor reduce la proliferación de las células GL261 [187]. De hecho, las células U87-MG fueron más sensibles al silenciamiento que las U251-MG. Este efecto es de gran importancia considerando la capacidad tumorigénica de las células, por lo que sería interesante continuar su estudio con un modelo de inactivación inducible del C/EBP β . La diferente respuesta de las células al silenciamiento del C/EBP β depende en gran medida del contexto celular, pues hay estudios que muestran que C/EBP β puede promover o inhibir la apoptosis en distintos modelos. En ratones KO para C/EBP β ,

los monocitos de sangre periférica se mueren por apoptosis, [206] mientras que los macrófagos son resistentes a la muerte inducida por interferón gamma [207]. La relación entre las isoformas LAP y LIP se observó en células derivadas de cáncer de mama metastásico en donde el exceso de LIP reduce el efecto citoestático de TGF β y la sobreexpresión de LAP los restablece [204]. En las células HT29 de cáncer de colon, la degradación de LIP promueve el fenotipo de resistencia a multidrogas al reducir la muerte celular dependiente de estrés del retículo endoplásmico [208], por lo que el exceso de LIP en las células U251-MG pudiera reducir la susceptibilidad a la muerte celular.

En las células U251-MG, el silenciamiento de C/EBP β incrementa la expresión del RP y en particular de RP-B. Este resultado correlaciona con los sitios predichos únicamente para el promotor de RP-B y sugiere que C/EBP β regula negativamente su expresión. En ratones KO para C/EBP β se reportaron alteraciones en el desarrollo de la glándula mamaria así como una menor respuesta a estímulos hormonales, pero a su vez se observó una mayor expresión del RP, RE α y RPrl [129,193,194]. En estos ratones la expresión del RP aumenta en el tejido mamario, más no en el tejido uterino [129] y en células estromales de endometrio humano se reportó que el silenciamiento de C/EBP β no altera la expresión del receptor [209] lo que sugiere una regulación tejido-específica. De manera interesante, en ratones KO para el RP se observó que la isoforma RP-B es fundamental para el desarrollo de la glándula mamaria mientras que RP-A es importante para la ovulación [80,81] lo que sugiere que C/EBP β podría participar en la regulación de las isoformas del RP de manera tejido-específica. Además, a través de estudios de microarreglos en células de cáncer de mama se encontró que RP-B regula la expresión de C/EBP β [82] y en el tejido uterino de ratones se reportó que el RP promueve la expresión de C/EBP β [201,210] sugiriendo un mecanismo de regulación mucho más complejo.

Por otro lado, el E2 induce la expresión del RP en el cerebro como se ha descrito en diferentes modelos animales, pero también bajo condiciones patológicas como en los astrocitomas [45,211]. En las células U251-MG, el tratamiento con E2 aumenta la expresión de C/EBP β y promueve su disociación del promotor de RP-B por lo que podría ser importante como un circuito de retroalimentación negativa. Además, al silenciarlo, se mantiene el incremento en la expresión del RP mediada por E2, lo que podría sugerir que C/EBP β funge como un regulador negativo de la expresión basal del RP. En células derivadas de un astrocitoma de grado III, el agonista específico de RE α propil-pirazol-triol incrementa el contenido del RP [212] y puesto que éste receptor se encuentra enriquecido en el promotor de RP-B en las células U251-MG sería interesante estudiar si existe una interacción entre C/EBP β y RE α que sea relevante para la regulación de la expresión del RP.

En un modelo de adipogénesis se encontró que el heterodímero LAP/LIP se asocia a complejos de desacetilasas de histonas (mSin3A/HDAC1) a través de LIP y a coactivadores (p300) mediante la interacción con LAP. Al tratar con glucocorticoides hay una acetilación de LIP que promueve la disociación de mSin3A/HDAC1 provocando un aumento en la activación transcripcional e inducción de la expresión del gen C/EBP α [140,151]. Sin embargo, la actividad transcripcional de C/EBP β también depende de modificaciones post-traduccionales como la fosforilación. Distintas vías de señalización que involucran la participación de cinasas como MAPK y PI3K/Akt inducen la fosforilación de C/EBP β y esto a su vez promueve la fosforilación por la glucógeno sintasa cinasa 3 (GSK3 β) [213,214]. En preadipocitos, la estimulación con la hormona de crecimiento inhibe de manera transitoria a la GSK3 β y promueve la desfosforilación de C/EBP β . Esto induce un cambio en la interacción de las isoformas del C/EBP β al promotor del gen *c-fos* pues se

promueve la asociación de LAP y se inhibe la de LIP. Este cambio induce un incremento en la expresión de *c-fos* [213]. En neuronas hipocampales de rata, el E2 activa de manera transitoria a GSK3 β tras 1 h de tratamiento, pero después la inhibe de manera sostenida hasta las 6 h [215]. Estos datos abren nuevas opciones para estudiar el papel del E2 en la fosforilación de C/EBP β mediada por GSK3 β y los posibles cambios que se puedan inducir en las capacidades de unión de LAP/LIP al promotor de RP-B en células de glioblastoma. No obstante, la interacción de las isoformas de C/EBP β con distintos remodeladores de la cromatina así como las marcas epigenéticas presentes en la región promotora del gen del RP son también importantes factores a considerar para conocer el mecanismo por el cual este factor regula la expresión de RP-B.

En este trabajo, como parte de una aproximación funcional del efecto que tiene el incremento en la expresión de RP-B en células con C/EBP β silenciado, se estudió la expresión de genes que son inducidos por la P4 y que son importantes en la progresión del cáncer como ciclina D1, EGFR y VAP-1 [41]. En glioblastomas, el gen de ciclina D1 se encuentra frecuentemente desregulado, mientras que el de EGFR está sobre-expresado [216]. En las células U251-MG, aunque se observó la inducción por P4 en condiciones basales, al silenciar a C/EBP β la expresión de ciclina D1 no se modificó y la de EGFR incluso disminuyó con respecto al tratamiento con vehículo. Sin embargo, la expresión basal de ambos genes incrementa sólo por efecto del silenciamiento de C/EBP β . En células de cáncer de mama, la isoforma LAP2 induce la expresión de ciclina D1 y LAP1 la inhibe debido a la SUMOilación de su dominio N-terminal y la interacción con los complejos de remodelación de la cromatina SNF2H and ACF1 [148,217,218]. Además, LAP1 y la ciclina D1 promueven la diferenciación de las células epiteliales del tejido mamario [147], lo que indica que ambas proteínas participan en la proliferación y diferenciación celulares. Por

otro lado, LIP inhibe la expresión de EGFR en células de cáncer de colon mutadas en KRAS [219], lo que podría explicar el incremento en EGFR tras el silenciamiento de C/EBP β en las células U251-MG. En biopsias de cáncer de mama se encontró una correlación negativa entre la expresión del RP y del RE con la de EGFR [220] y en células de cáncer de endometrio la expresión de RP-B está asociada a niveles bajos en la expresión de EGFR [221], lo cual podría explicar la reducción de la expresión de este gen en las células Lv-CEBP β tratadas con P4. Sin embargo, en biopsias de glioblastomas tanto EGFR como RP-B están sobre-expresadas [3,222], por lo que podrían participar también mecanismos de regulación epigenética como son las modificaciones H3K27ac y H3K4me3, las cuales se encuentran enriquecidas en el promotor de EGFR en glioblastomas [223].

Con respecto al gen VAP-1 se sabe que se encuentra sobre-expresado en glioblastomas y se induce por P4 [200,224], pero hasta el momento no hay datos de la participación de C/EBP β en la regulación de su expresión. VAP-1 muestra una tendencia a incrementar su expresión tras el silenciamiento de C/EBP β y la regulación por P4 se mantiene tanto en la condición control como en Lv-CEBP β . Estos datos muestran que en células de glioblastoma la expresión de los genes de ciclina D1, EGFR y VAP-1 depende de múltiples mecanismos incluyendo aquellos mediados por el RP y por C/EBP β .

IX. Conclusiones

En este trabajo se estudió la participación del factor C/EBP β en la regulación de la expresión de las isoformas del RP en glioblastomas humanos. De acuerdo a los datos obtenidos, el promotor de RP-B tiene tres potenciales sitios de unión para C/EBP. En las líneas celulares derivadas de glioblastomas humanos la tasa de expresión de las isoformas

de C/EBP β y RP varía en cada contexto celular. El factor C/EBP β regula negativamente la expresión de RP-B en las células U251-MG y participa en la expresión dependiente de E2. Además, la expresión de genes blanco de la P4 en las células U251-MG es regulada por diversos mecanismos incluyendo aquellos mediados por RP-B y C/EBP β . En conjunto, el factor de transcripción C/EBP β es fundamental en la regulación de la expresión diferencial de las isoformas del RP en glioblastomas.

X. Perspectivas

Este trabajo abre nuevas perspectivas con respecto a los mecanismos de regulación implicados en la expresión diferencial de las isoformas del RP los cuales son importantes no sólo en los glioblastomas si no también en otros tipos de cáncer. Sin embargo, aún falta realizar estudios que permitan dilucidar el papel que juega el factor C/EBP β en la regulación de la expresión de RP-B en los glioblastomas humanos. Para ello es necesario realizar análisis de mutagénesis dirigida utilizando una construcción que contenga al promotor del RP-B asociado a un gen reportero. Esto con el fin de determinar el sitio exacto de unión del C/EBP β al promotor de RP-B así como su capacidad de inhibir la transcripción. Además, se espera poder realizar estudios de reconstitución *in vitro* de cada una de las isoformas del C/EBP β para evaluar el papel que juega cada una de ellas en la regulación de la expresión de RP-B. Incluso sería también importante evaluar la interacción que puedan tener dichas isoformas con los factores de transcripción Sp1 y RE α en la regulación mediada por estrógenos. Además, sería relevante estudiar el papel del factor C/EBP β en la regulación de la expresión del RP en biopsias de pacientes con glioblastomas.

XI. Referencias

- [1] Graham JD, Clarke CL. Physiological action of progesterone in target tissues. *Endocr Rev* 1997;18:502–19.
- [2] Scarpin KM, Graham JD, Mote PA, Clarke CL. Progesterone action in human tissues: regulation by progesterone receptor (PR) isoform expression, nuclear positioning and coregulator expression. *Nucl Recept Signal* 2009;7:1–13.
- [3] González-Agüero G, Ondarza R, Gamboa-Domínguez A, Cerbón MA, Camacho-Arroyo I. Progesterone receptor isoforms expression pattern in human astrocytomas. *Brain Res Bull* 2001;56:43–8.
- [4] Khalid H, Shibata S, Kishikawa M, Yasunaga A, Iseki M, Hiura T. Immunohistochemical analysis of progesterone receptor and Ki-67 labeling index in astrocytic tumors. *Cancer* 1997;80:2133–40.
- [5] Petz LN, Ziegler YS, Schultz JR, Kim H, Kemper JK, Nardulli AM. Differential regulation of the human progesterone receptor gene through an estrogen response element half site and Sp1 sites. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2004;88:113–22.
- [6] Schultz JR, Petz LN, Nardulli AM. Estrogen receptor alpha and Sp1 regulate progesterone receptor gene expression. *Mol Cell Endocrinol* 2003;201:165–75.
- [7] Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, et al. The 2016 World Health Organization classification of tumors of the central nervous system: A summary. *Acta Neuropathol* 2016;131:803–20.
- [8] Ostrom QT, Gittleman H, Fulop J, Liu M, Blanda R, Kromer C, et al. CBTRUS statistical report: Primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2008-2012. *Neuro Oncol* 2015;17:iv1-iv62.
- [9] Cowppli-Bony A, Bouvier G, Rué M, Loiseau H, Vital A, Lebailly P, et al. Brain tumors and hormonal factors: Review of the epidemiological literature. *Cancer Causes Control* 2011;22:697–714.
- [10] Schwartzbaum JA, Fisher JL, Aldape KD, Wrensch M. Epidemiology and molecular pathology of glioma. *Nat Clin Pract Neurol* 2006;2:494–503.
- [11] Piña-Medina AG, Hansberg-Pastor V, González-Arenas A, Cerbón M, Camacho-Arroyo I. Progesterone promotes cell migration, invasion and cofilin activation in human astrocytoma cells. *Steroids* 2016;105:19–25.
- [12] González-Agüero G, Gutiérrez AA, González-Espinosa D, Solano JD, Morales R, González-Arenas A, et al. Progesterone effects on cell growth of U373 and D54 human astrocytoma cell lines. *Endocrine* 2007;32:129–35.
- [13] Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol* 2007;114:97–109.
- [14] Johnson DR, Brown PD, Galanis E, Hammack JE. Pilocytic astrocytoma survival in adults: Analysis of the surveillance, epidemiology, and end results program of the National Cancer Institute. *J Neurooncol* 2012;108:187–93.
- [15] Forst DA, Nahed B V, Loeffler JS, Batchelor TT. Low-grade gliomas. *Oncologist* 2014;19:403–13.
- [16] Tandon A, Schiff D. Therapeutic decision making in patients with newly diagnosed low grade glioma. *Curr Treat Options Oncol* 2014;15:529–38.
- [17] de Groot JF. High-grade gliomas. *Continuum (N Y)* 2015;21:332–44.

- [18] Dunn GP, Rinne ML, Wykosky J, Genovese G, Quayle SN, Dunn IF, et al. Emerging insights into the molecular and cellular basis of glioblastoma. *Genes Dev* 2012;26:756–84.
- [19] Furnari FB, Fenton T, Bachoo RM, Mukasa A, Stommel JM, Stegh A, et al. Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. *Genes Dev* 2007;21:2683–710.
- [20] Alifieris C, Trafalis DT. Glioblastoma multiforme: Pathogenesis and treatment. *Pharmacol Ther* 2015;152:63–82.
- [21] Siegal T. Clinical Relevance of Prognostic and Predictive Molecular Markers in Gliomas. *Adv. Tech. Stand. Neurosurg.*, 2016, p. 91–108.
- [22] Waitkus MS, Diplas BH, Yan H. Isocitrate dehydrogenase mutations in gliomas. *Neuro Oncol* 2016;18:16–26.
- [23] Filbin MG, Suvà ML. Gliomas genomics and epigenomics: Arriving at the start and knowing it for the first time. *Annu Rev Pathol* 2016;11:497–521.
- [24] Liu A, Hou C, Chen H, Zong X, Zong P. Genetics and epigenetics of glioblastoma: Applications and overall incidence of IDH1 mutation. *Front Oncol* 2016;6:1–9.
- [25] Brat DJ, Verhaak RGW, Aldape KD, Yung WKA, Salama SR, Cooper LAD, et al. Comprehensive, integrative genomic analysis of diffuse lower-grade gliomas. *N Engl J Med* 2015;372:2481–98.
- [26] Aldape K, Zadeh G, Mansouri S, Reifenberger G, von Deimling A. Glioblastoma: pathology, molecular mechanisms and markers. *Acta Neuropathol* 2015;129:829–48.
- [27] Van Meir EG, Hadjipanayis CG, Norden AD, Shu HK, Wen PY, Olson JJ. Exciting new advances in neuro-oncology: The avenue to a cure for malignant glioma. *CA Cancer J Clin* 2010;60:166–93.
- [28] Verhaak RGW, Hoadley KA, Purdom E, Wang V, Qi Y, Wilkerson MD, et al. Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell* 2010;17:98–110.
- [29] Hervey-Jumper SL, Berger MS. Reoperation for recurrent high-grade glioma: a current perspective of the literature. *Neurosurgery* 2014;75:491–9.
- [30] Roy S, Lahiri D, Maji T, Biswas J. Recurrent glioblastoma: Where we stand. *South Asian J Cancer* 2015;4:163–73.
- [31] Bradshaw A, Wickremsekera A, Tan ST, Peng L, Davis PF, Itinteang T. Cancer stem cell hierarchy in glioblastoma multiforme. *Front Surg* 2016;3:1–15.
- [32] He W, Liu R, Yang S-H, Yuan F. Chemotherapeutic effect of tamoxifen on temozolomide-resistant gliomas. *Anticancer Drugs* 2015;26:293–300.
- [33] Sareddy GR, Li X, Liu J, Viswanadhapalli S, Garcia L, Gruslova A, et al. Selective estrogen receptor β agonist LY500307 as a novel therapeutic agent for glioblastoma. *Sci Rep* 2016;6:24185.
- [34] Ramaswamy R, Ashton K, Lea R, Roberts P, Davis CH, Golash A, et al. Study of effectiveness of mifepristone for glioma cell line growth suppression. *Br J Neurosurg* 2012;26:336–9.
- [35] Check JH, Wilson C, Cohen R, Sarumi M. Evidence that mifepristone, a progesterone receptor antagonist, can cross the blood brain barrier and provide palliative benefits for glioblastoma multiforme grade IV. *Anticancer Res* 2014;34:2385–8.
- [36] Llaguno-Munive M, Medina LA, Jurado R, Romero-Piña M, Garcia-Lopez P.

- Mifepristone improves chemo-radiation response in glioblastoma xenografts. *Cancer Cell Int* 2013;13:1–8.
- [37] Pallud J, Mandonnet E, Deroulers C, Fontaine D, Badoual M, Capelle L, et al. Pregnancy increases the growth rates of World Health Organization grade II gliomas. *Ann Neurol* 2010;67:398–404.
- [38] Scarrott LJ, Raina A, Madej T, Rajesh U. Recurrent glioblastoma multiforme in pregnancy. *J Obstet Gynaecol (Lahore)* 2012;32:704–5.
- [39] Germán-Castelán L, Manjarrez-Marmolejo J, González-Arenas A, González-Morán MG, Camacho-Arroyo I. Progesterone induces the growth and infiltration of human astrocytoma cells implanted in the cerebral cortex of the rat. *Biomed Res Int* 2014;2014:1–8.
- [40] Pinski J, Halmos G, Shirahige Y, Wittliff JL, Schally A V. Inhibition of growth of the human malignant glioma cell line (U87MG) by the steroid hormone antagonist RU486. *J Clin Endocrinol Metab* 1993;77:1388–92.
- [41] Hernandez-Hernandez OT, Gonzalez-Garcia TK, Camacho-Arroyo I. Progesterone receptor and SRC-1 participate in the regulation of VEGF, EGFR and Cyclin D1 expression in human astrocytoma cell lines. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2012;132:127–34.
- [42] Carroll RS, Zhang J, Dashner K, Sar M, Black PM. Steroid hormone receptors in astrocytic neoplasms. *Neurosurgery* 1995;37:496–503.
- [43] Assimakopoulou M, Sotiropoulou-Bonikou G, Maraziotis T, Varakis J. Does sex steroid receptor status have any prognostic or predictive significance in brain astrocytic tumors? *Clin Neuropathol* 1998;17:27–34.
- [44] Inoue T, Akahira J-I, Suzuki T, Darnel AD, Kaneko C, Takahashi K, et al. Progesterone production and actions in the human central nervous system and neurogenic tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:5325–31.
- [45] Cabrera-Muñoz E, González-Arenas A, Saqui-Salces M, Camacho J, Larrea F, García-Becerra R, et al. Regulation of progesterone receptor isoforms content in human astrocytoma cell lines. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2009;113:80–4.
- [46] Hansberg-Pastor V, González-Arenas A, Peña-Ortiz MA, García-Gómez E, Rodríguez-Dorantes M, Camacho-Arroyo I. The role of DNA methylation and histone acetylation in the regulation of progesterone receptor isoforms expression in human astrocytoma cell lines. *Steroids* 2013;78:500–7.
- [47] Jacobsen BM, Horwitz KB. Progesterone receptors, their isoforms and progesterone regulated transcription. *Mol Cell Endocrinol* 2012;357:18–29.
- [48] Graham JD, Yager ML, Hill HD, Byth K, O'Neill GM, Clarke CL. Altered progesterone receptor isoform expression remodels progestin responsiveness of breast cancer cells. *Mol Endocrinol* 2005;19:2713–35.
- [49] Ellmann S, Sticht H, Thiel F, Beckmann MW, Strick R, Strissel PL. Estrogen and progesterone receptors: from molecular structures to clinical targets. *Cell Mol Life Sci* 2009;66:2405–26.
- [50] Yen PM. Classical nuclear hormone receptor activity as a mediator of complex biological responses: A look at health and disease. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2015;29:517–28.
- [51] Zhi X, Zhou XE, Melcher K, Xu HE. Structures and regulation of non-X orphan nuclear receptors: A retinoid hypothesis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2016;157:27–40.

- [52] Patel B, Elguero S, Thakore S, Dahoud W, Bedaiwy M, Mesiano S. Role of nuclear progesterone receptor isoforms in uterine pathophysiology. *Hum Reprod Update* 2015;21:155–73.
- [53] O’Connell LA, Ding JH, Hofmann HA. Sex differences and similarities in the neuroendocrine regulation of social behavior in an African cichlid fish. *Horm Behav* 2013;64:468–76.
- [54] Guerra-Araiza C, Gómora-Arrati P, García-Juárez M, Armengual-Villegas A, Miranda-Martínez A, Lima-Hernández FJ, et al. Role of progesterone receptor isoforms in female sexual behavior induced by progestins in rats. *Neuroendocrinology* 2009;90:73–81.
- [55] Camacho-Arroyo I, Gonzalez-Arenas A, Gonzalez-Aguero G, Guerra-Araiza C, Gonzalez-Moran G. 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* 2003;136:447–52.
- [56] Hanna RN, Daly SCJ, Pang Y, Anglade I, Kah O, Thomas P, et al. Characterization and expression of the nuclear progestin receptor in zebrafish gonads and brain. *Biol Reprod* 2010;82:112–22.
- [57] Tian J, Kim S, Heilig E, Ruderman J V. Identification of XPR-1, a progesterone receptor required for *Xenopus* oocyte activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:14358–63.
- [58] Kastner P, Krust A, Turcotte B, Stropp U, Tora L, Gronemeyer H, et al. Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B. *EMBO J* 1990;9:1603–14.
- [59] Goswami D, Callaway C, Pascal BD, Kumar R, Edwards DP, Griffin PR. Influence of domain interactions on conformational mobility of the progesterone receptor detected by hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry. *Structure* 2014;22:961–73.
- [60] Helsen C, Claessens F. Looking at nuclear receptors from a new angle. *Mol Cell Endocrinol* 2014;382:97–106.
- [61] Edwards DP, Wardell SE, Boonyaratanakornkit V. Progesterone receptor interacting coregulatory proteins and cross talk with cell signaling pathways. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2002;83:173–86.
- [62] Wärnmark A, Treuter E, Wright APH, Gustafsson J-Å. Activation functions 1 and 2 of nuclear receptors: Molecular strategies for transcriptional activation. *Mol Endocrinol* 2003;17:1901–9.
- [63] Cato L, Neeb A, Brown M, Cato ACB. Control of steroid receptor dynamics and function by genomic actions of the cochaperones p23 and Bag-1L. *Nucl Recept Signal* 2014;12:1–15.
- [64] Ceballos-Chávez M, Subtil-Rodríguez A, Giannopoulou EG, Soronellas D, Vázquez-Chávez E, Vicent GP, et al. The chromatin remodeler CHD8 is required for activation of progesterone receptor-dependent enhancers. *PLoS Genet* 2015;11:1–25.
- [65] Jacobsen BM, Jambal P, Schittone SA, Horwitz KB. ALU repeats in promoters are position-dependent co-response elements (coRE) that enhance or repress transcription by dimeric and monomeric progesterone receptors. *Mol Endocrinol* 2009;23:989–1000.
- [66] Goldhar AS, Duan R, Ginsburg E, Vonderhaar BK. Progesterone induces expression

- of the prolactin receptor gene through cooperative action of Sp1 and C/EBP. *Mol Cell Endocrinol* 2011;335:148–57.
- [67] Hsu S-P, Yang H-C, Kuo C-T, Wen H-C, Chen L-C, Huo Y-N, et al. Progesterone receptor-NFκB complex formation is required for progesterone-induced NFκB nuclear translocation and binding onto the p53 promoter. *Endocrinology* 2015;156:291–300.
- [68] Owen GI, Richer JK, Tung L, Takimoto G, Horwitz KB. Progesterone regulates transcription of the p21(WAF1) cyclin- dependent kinase inhibitor gene through Sp1 and CBP/p300. *J Biol Chem* 1998;273:10696–701.
- [69] Tseng L, Tang M, Wang Z, Mazella J. Progesterone receptor (hPR) upregulates the fibronectin promoter activity in human decidual fibroblasts. *DNA Cell Biol* 2003;22:633–40.
- [70] Lange CA, Shen T, Horwitz KB. Phosphorylation of human progesterone receptors at serine-294 by mitogen-activated protein kinase signals their degradation by the 26S proteasome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:1032–7.
- [71] Camacho-Arroyo I, Villamar-Cruz O, Gonzalez-Arenas A, Guerra-Araiza C. Participation of the 26S proteasome in the regulation of progesterone receptor concentrations in the rat brain. *Neuroendocrinology* 2002;76:267–71.
- [72] Villamar-Cruz O, Manjarrez-Marmolejo J, Alvarado R, Camacho-Arroyo I. 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* 2006;69:276–81.
- [73] Camacho-Arroyo I, Hansberg-Pastor V, Vázquez-Martínez ER, Cerbón M. Mechanism of progesterone action in the brain. In: Pfaff DW, Joëls M, editors. *Horm. Brain, Behav.* 3rd ed., Oxford, UK: Academic Press, Elsevier; 2017, p. 181–214.
- [74] Vicent GP, Nacht AS, Zaurin R, Font-Mateu J, Soronellas D, Le Dily F, et al. Unliganded progesterone receptor-mediated targeting of an RNA-containing repressive complex silences a subset of hormone-inducible genes. *Genes Dev* 2013;27:1179–97.
- [75] Connaghan KD, Heneghan AF, Miura MT, Bain DL. Na⁺ and K⁺ allosterically regulate cooperative DNA binding by the human progesterone receptor. *Biochemistry* 2010;49:422–31.
- [76] Botos J, Xian W, Smith DF, Smith CL. Progesterone receptor deficient in chromatin binding has an altered cellular state. *J Biol Chem* 2004;279:15231–9.
- [77] Szwarc MM, Kommagani R, Lessey BA, Lydon JP. The p160/steroid receptor coactivator family: potent arbiters of uterine physiology and dysfunction. *Biol Reprod* 2014;91:1–11.
- [78] Khushi M, Clarke CL, Graham JD. Bioinformatic analysis of cis-regulatory interactions between progesterone and estrogen receptors in breast cancer. *PeerJ* 2014;2:1–20.
- [79] Hill KK, Roemer SC, Churchill MEA, Edwards DP. Structural and functional analysis of domains of the progesterone receptor. *Mol Cell Endocrinol* 2012;348:418–29.
- [80] Fernandez-Valdivia R, Mukherjee A, Mulac-Jericevic B, Conneely OM, DeMayo FJ, Amato P, et al. Revealing progesterone's role in uterine and mammary gland biology: Insights from the mouse. *Semin Reprod Med* 2005;23:22–37.

- [81] Conneely OM, Lydon JP. Progesterone receptors in reproduction: functional impact of the A and B isoforms. *Steroids* 2000;65:571–7.
- [82] Richer JK, Jacobsen BM, Manning NG, Abel MG, Wolf DM, Horwitz KB. Differential gene regulation by the two progesterone receptor isoforms in human breast cancer cells. *J Biol Chem* 2002;277:5209–18.
- [83] Yudit MR, Berrodin TJ, Jelinsky SA, Hanna LA, Brown EL, Chippari S, et al. Selective and opposing actions of progesterone receptor isoforms in human endometrial stromal cells. *Mol Cell Endocrinol* 2006;247:116–26.
- [84] Boonyaratanakornkit V, Bi Y, Rudd M, Edwards DP. The role and mechanism of progesterone receptor activation of extra-nuclear signaling pathways in regulating gene transcription and cell cycle progression. *Steroids* 2008;73:922–8.
- [85] Leslie KK, Stein MP, Kumar NS, Dai D, Stephens J, Wandinger-Ness A, et al. Progesterone receptor isoform identification and subcellular localization in endometrial cancer. *Gynecol Oncol* 2005;96:32–41.
- [86] Li H, Fidler ML, Lim CS. Effect of initial subcellular localization of progesterone receptor on import kinetics and transcriptional activity. *Mol Pharm* 2005;2:509–18.
- [87] Conneely OM, Mulac-jericevic B, Lydon JP. Progesterone-dependent regulation of female reproductive activity by two distinct progesterone receptor isoforms. *Steroids* 2003;68:771–8.
- [88] Giangrande PH, Kimbrel EA, Edwards DP, McDonnell DP. The opposing transcriptional activities of the two isoforms of the human progesterone receptor are due to differential cofactor binding. *Mol Cell Biol* 2000;20:3102–15.
- [89] Sartorius CA, Melville MY, Hovland AR, Tung L, Takimoto GS, Horwitz KB. A third transactivation function (AF3) of human progesterone receptors located in the unique N-terminal segment of the B-isoform. *Mol Endocrinol* 1994;8:1347–60.
- [90] Tung L, Abdel-Hafiz H, Shen T, Harvell DME, Nitao LK, Richer JK, et al. Progesterone receptors (PR)-B and -A regulate transcription by different mechanisms: AF-3 exerts regulatory control over coactivator binding to PR-B. *Mol Endocrinol* 2006;20:2656–70.
- [91] Bain DL, Franden MA, McManaman JL, Takimoto GS, Horwitz KB. The N-terminal region of human progesterone B-receptors: biophysical and biochemical comparison to A-receptors. *J Biol Chem* 2001;276:23825–31.
- [92] Molenda-Figueira HA, Williams CA, Griffin AL, Rutledge EM, Blaustein JD, Tetel MJ. Nuclear receptor coactivators function in estrogen receptor- and progestin receptor-dependent aspects of sexual behavior in female rats. *Horm Behav* 2006;50:383–92.
- [93] Spencer TE, Jenster G, Burcin MM, Allis CD, Zhou J, Mizzen CA, et al. Steroid receptor coactivator-1 is a histone acetyltransferase. *Nature* 1997;389:194–8.
- [94] Obeid J-P, Zafar N, El Hokayem J. Steroid hormone receptor coregulators in endocrine cancers. *IUBMB Life* 2016;68:504–15.
- [95] Daniel AR, Knutson TP, Lange CA. Signaling inputs to progesterone receptor gene regulation and promoter selectivity. *Mol Cell Endocrinol* 2009;308:47–52.
- [96] Knutson TP, Daniel AR, Fan D, Silverstein KA, Covington KR, Fuqua SA, et al. Phosphorylated and sumoylation-deficient progesterone receptors drive proliferative gene signatures during breast cancer progression. *Breast Cancer Res* 2012;14:1–23.
- [97] Abdel-Hafiz HA, Horwitz KB. Role of epigenetic modifications in luminal breast cancer. *Epigenomics* 2015;7:847–62.

- [98] González-Arenas A, Peña-Ortiz MA, Hansberg-Pastor V, Marquina-Sánchez B, Baranda-Ávila N, Nava-Castro K, et al. PKC α and PKC δ activation regulates transcriptional activity and degradation of progesterone receptor in human astrocytoma cells. *Endocrinology* 2015;156:1010–22.
- [99] Mani S. Progesterin receptor subtypes in the brain: the known and the unknown. *Endocrinology* 2008;149:2750–6.
- [100] Portela A, Esteller M. Epigenetic modifications and human disease. *Nat Biotechnol* 2010;28:1057–68.
- [101] Bhattacharjee, Dipanjan Shenoy S, Bairy KL. DNA methylation and chromatin remodeling: The blueprint of cancer epigenetics. *Scientifica (Cairo)* 2016;2016:1–11.
- [102] Sasaki M, Kaneuchi M, Fujimoto S, Tanaka Y, Dahiya R. Hypermethylation can selectively silence multiple promoters of steroid receptors in cancers. *Mol Cell Endocrinol* 2003;202:201–7.
- [103] Zhuang Y, Cui H, Liu S, Zheng D, Liu C. Progesterone receptor B promoter hypermethylation in human placenta after labor onset. *Reprod Sci* 2015;22:335–42.
- [104] Chai SY, Smith R, Fitter JT, Mitchell C, Pan X, Ilicic M, et al. Increased progesterone receptor A expression in labouring human myometrium is associated with decreased promoter occupancy by the histone demethylase JARID1A. *Mol Hum Reprod* 2014;20:442–53.
- [105] Wargon V, Fernandez S V, Goin M, Giulianelli S, Russo J, Lanari C. Hypermethylation of the progesterone receptor A in constitutive antiprogestin-resistant mouse mammary carcinomas. *Breast Cancer Res Treat* 2011;126:319–32.
- [106] Sasaki M, Dharia A, Oh BR, Tanaka Y, Fujimoto S, Dahiya R. Progesterone receptor B gene inactivation and CpG hypermethylation in human uterine endometrial cancer. *Cancer Res* 2001;61:97–102.
- [107] Mirza S, Sharma G, Prasad CP, Parshad R, Srivastava A, Gupta SD, et al. Promoter hypermethylation of TMS1, BRCA1, ER α and PRB in serum and tumor DNA of invasive ductal breast carcinoma patients. *Life Sci* 2007;81:280–7.
- [108] Ren Y, Liu X, Ma D, Feng Y, Zhong N. Down-regulation of the progesterone receptor by the methylation of progesterone receptor gene in endometrial cancer cells. *Cancer Genet Cytogenet* 2007;175:107–16.
- [109] Billam M, Sobolewski MD, Davidson NE. Effects of a novel DNA methyltransferase inhibitor zebularine on human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 2010;120:581–92.
- [110] Rothbart SB, Strahl BD. Interpreting the language of histone and DNA modifications. *Biochim Biophys Acta* 2014;1839:627–43.
- [111] Bonéy-Montoya J, Ziegler YS, Curtis CD, Montoya JA, Nardulli AM. Long-range transcriptional control of progesterone receptor gene expression. *Mol Endocrinol* 2010;24:346–58.
- [112] Xu X, Murdoch FE, Curran EM, Welshons W V, Fritsch MK. 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* 2004;328:143–51.
- [113] Leu YW, Yan PS, Fan M, Jin VX, Liu JC, Curran EM, et al. Loss of estrogen receptor signaling triggers epigenetic silencing of downstream targets in breast cancer. *Cancer Res* 2004;64:8184–92.
- [114] Stratmann A, Haendler B. The histone demethylase JARID1A regulates

- progesterone receptor expression. *FEBS J* 2011;278:1458–69.
- [115] Huang V, Li L-C. miRNA goes nuclear. *RNA Biol* 2012;9:269–73.
- [116] Younger ST, Corey DR. Transcriptional gene silencing in mammalian cells by miRNA mimics that target gene promoters. *Nucleic Acids Res* 2011;39:5682–91.
- [117] Cui W, Li Q, Feng L, Ding W. MiR-126-3p regulates progesterone receptors and involves development and lactation of mouse mammary gland. *Mol Cell Biochem* 2011;355:17–25.
- [118] Liu J-L, Liang X-H, Su R-W, Lei W, Jia B, Feng X-H, et al. Combined analysis of microRNome and 3'-UTRome reveals a species-specific regulation of progesterone receptor expression in the endometrium of rhesus monkey. *J Biol Chem* 2012;287:13899–910.
- [119] Petz LN, Nardulli AM. Sp1 binding sites and an estrogen response element half-site are involved in regulation of the human progesterone receptor A promoter. *Mol Endocrinol* 2000;14:972–85.
- [120] Su X, Song HY. Surface plasmon resonance study of cooperative interactions of estrogen receptor α and specificity protein 1 with composite DNA elements. *Methods Mol Biol* 2016;1366:261–70.
- [121] Petz LN, Ziegler YS, Loven MA, Nardulli AM. Estrogen receptor alpha and activating protein-1 mediate estrogen responsiveness of the progesterone receptor gene in MCF-7 breast cancer cells. *Endocrinology* 2002;143:4583–91.
- [122] Petz LN, Ziegler YS, Schultz JR, Nardulli AM. Fos and Jun inhibit estrogen-induced transcription of the human progesterone receptor gene through an activator protein-1 site. *Mol Endocrinol* 2004;18:521–32.
- [123] Schultz JR, Petz LN, Nardulli AM. Cell- and ligand-specific regulation of promoters containing activator protein-1 and Sp1 sites by estrogen receptors alpha and beta. *J Biol Chem* 2005;280:347–54.
- [124] Yang C, Chen L, Cuiqi L, Lynch MC, Brisken C, Schmidt E V. Cyclin D1 enhances the response to estrogen and progesterone by regulating progesterone receptor expression. *Mol Cell Biol* 2010;30:3111–25.
- [125] Sriraman V, Sharma SC, Richards JS. Transactivation of the progesterone receptor gene in granulosa cells: evidence that Sp1/Sp3 binding sites in the proximal promoter play a key role in luteinizing hormone inducibility. *Mol Endocrinol* 2003;17:436–49.
- [126] Huggins GS, Wong JYY, Hankinson SE, De Vivo I. GATA5 activation of the progesterone receptor gene promoter in breast cancer cells is influenced by the +331G/A polymorphism. *Cancer Res* 2006;66:1384–90.
- [127] Kalet BT, Anglin SR, Handschy A, O'Donoghue LE, Halsey C, Chubb L, et al. Transcription factor Ets1 cooperates with estrogen receptor α to stimulate estradiol-dependent growth in breast cancer cells and tumors. *PLoS One* 2013;8:1–12.
- [128] Clementi C, Tripurani SK, Large MJ, Edson MA, Creighton CJ, Hawkins SM, et al. Activin-like kinase 2 functions in peri-implantation uterine signaling in mice and humans. *PLoS Genet* 2013;9:e1003863.
- [129] Seagroves TN, Lydon JP, Hovey RC, Vonderhaar BK, Rosen JM. C/EBPbeta (CCAAT/enhancer binding protein) controls cell fate determination during mammary gland development. *Mol Endocrinol* 2000;14:359–68.
- [130] Vinson C, Acharya A, Taparowsky EJ. Deciphering B-ZIP transcription factor interactions in vitro and in vivo. *Biochim Biophys Acta* 2006;1759:4–12.

- [131] Ramji DP, Foka P. CCAAT/enhancer-binding proteins: structure, function and regulation. *Biochem J* 2002;365:561–75.
- [132] Tsukada J, Yoshida Y, Kominato Y, Auron PE. The CCAAT/enhancer (C/EBP) family of basic-leucine zipper (bZIP) transcription factors is a multifaceted highly-regulated system for gene regulation. *Cytokine* 2011;54:6–19.
- [133] Nerlov C. The C/EBP family of transcription factors: a paradigm for interaction between gene expression and proliferation control. *Trends Cell Biol* 2007;17:318–24.
- [134] Descombes P, Schibler U. A liver-enriched transcriptional activator protein, LAP, and a transcriptional inhibitory protein, LIP, are translated from the same mRNA. *Cell* 1991;67:569–79.
- [135] Zahnow CA. CCAAT/enhancer binding proteins in normal mammary development and breast cancer. *Breast Cancer Res* 2002;4:113–21.
- [136] Cao Z, Umek RM, McKnight SL. Regulated expression of three C/EBP isoforms during adipose conversion of 3T3-L1 cells. *Genes Dev* 1991;5:1538–52.
- [137] Pulido-Salgado M, Vidal-Taboada JM, Saura J. C/EBP β and C/EBP δ transcription factors: Basic biology and roles in the CNS. *Prog Neurobiol* 2015;132:1–33.
- [138] Williams SC, Baer M, Dillner AJ, Johnson PF. CRP2 (C/EBP beta) contains a bipartite regulatory domain that controls transcriptional activation, DNA binding and cell specificity. *EMBO J* 1995;14:3170–83.
- [139] Kowenz-Leutz E, Twamley G, Ansieau S, Leutz A. Novel mechanism of C/EBP beta (NF-M) transcriptional control: activation through derepression. *Genes Dev* 1994;8:2781–91.
- [140] Abdou H-S, Atlas E, Haché RJG. A positive regulatory domain in CCAAT/enhancer binding protein β (C/EBPB) is required for the glucocorticoid-mediated displacement of histone deacetylase 1 (HDAC1) from the C/ebp α promoter and maximum adipogenesis. *Endocrinology* 2013;154:1454–64.
- [141] Zahnow CA. CCAAT/enhancer-binding protein beta: its role in breast cancer and associations with receptor tyrosine kinases. *Expert Rev Mol Med* 2009;11:1–34.
- [142] Kowenz-Leutz E, Pless O, Dittmar G, Knoblich M, Leutz A. Crosstalk between C/EBPbeta phosphorylation, arginine methylation, and SWI/SNF/Mediator implies an indexing transcription factor code. *EMBO J* 2010;29:1105–15.
- [143] Xiong W, Hsieh CC, Kurtz AJ, Rabek JP, Papaconstantinou J. Regulation of CCAAT/enhancer-binding protein-beta isoform synthesis by alternative translational initiation at multiple AUG start sites. *Nucleic Acids Res* 2001;29:3087–98.
- [144] Timchenko NA, Welm AL, Lu X, Timchenko LT. CUG repeat binding protein (CUGBP1) interacts with the 5' region of C/EBPbeta mRNA and regulates translation of C/EBPbeta isoforms. *Nucleic Acids Res* 1999;27:4517–25.
- [145] Calkhoven CF, Müller C, Leutz A. Translational control of C/EBPalpha and C/EBPbeta isoform expression. *Genes Dev* 2000;14:1920–32.
- [146] Seagroves TN, Krnacik S, Raught B, Gay J, Burgess-Beusse B, Darlington GJ, et al. C/EBPbeta, but not C/EBPalpha, is essential for ductal morphogenesis, lobuloalveolar proliferation, and functional differentiation in the mouse mammary gland. *Genes Dev* 1998;12:1917–28.
- [147] Liu Q, Boudot A, Ni J, Hennessey T, Beauparlant SL, Rajabi HN, et al. Cyclin D1 and C/EBP β LAP1 operate in a common pathway to promote mammary epithelial cell differentiation. *Mol Cell Biol* 2014;34:3168–79.

- [148] Eaton EM, Hanlon M, Bundy L, Sealy L. Characterization of C/EBPbeta isoforms in normal versus neoplastic mammary epithelial cells. *J Cell Physiol* 2001;189:91–105.
- [149] Wang W-L, Lee Y-C, Yang W-M, Chang W-C, Wang J-M. Sumoylation of LAP1 is involved in the HDAC4-mediated repression of COX-2 transcription. *Nucleic Acids Res* 2008;36:6066–79.
- [150] Armstrong DA, Phelps LN, Vincenti MP. CCAAT enhancer binding protein-beta regulates matrix metalloproteinase-1 expression in interleukin-1beta-stimulated A549 lung carcinoma cells. *Mol Cancer Res* 2009;7:1517–24.
- [151] Abdou H-S, Atlas E, Haché RJG. Liver-enriched inhibitory protein (LIP) actively inhibits preadipocyte differentiation through histone deacetylase 1 (HDAC1). *J Biol Chem* 2011;286:21488–99.
- [152] An MR, Hsieh CC, Reisner PD, Rabek JP, Scott SG, Kuninger DT, et al. Evidence for posttranscriptional regulation of C/EBPalpha and C/EBPbeta isoform expression during the lipopolysaccharide-mediated acute-phase response. *Mol Cell Biol* 1996;16:2295–306.
- [153] Luedde T, Duderstadt M, Streetz KL, Tacke F, Kubicka S, Manns MP, et al. C/EBP beta isoforms LIP and LAP modulate progression of the cell cycle in the regenerating mouse liver. *Hepatology* 2004;40:356–65.
- [154] Miura Y, Hagiwara N, Radisky DC, Hirai Y. CCAAT/enhancer binding protein beta (C/EBPβ) isoform balance as a regulator of epithelial-mesenchymal transition in mouse mammary epithelial cells. *Exp Cell Res* 2014;327:146–55.
- [155] Bégay V, Smink JJ, Loddenkemper C, Zimmermann K, Rudolph C, Scheller M, et al. Dereglulation of the endogenous C/EBPβ LIP isoform predisposes to tumorigenesis. *J Mol Med* 2015;93:39–49.
- [156] Saint-Auret G, Danan J-L, Hiron M, Blache C, Sulpice E, Tendil S, et al. Characterization of the transcriptional signature of C/EBPbeta isoforms (LAP/LIP) in Hep3B cells: implication of LIP in pro-survival functions. *J Hepatol* 2011;54:1185–94.
- [157] Calella AM, Nerlov C, Lopez RG, Sciarretta C, von Bohlen und Halbach O, Bereshchenko O, et al. Neurotrophin/Trk receptor signaling mediates C/EBPalpha, -beta and NeuroD recruitment to immediate-early gene promoters in neuronal cells and requires C/EBPs to induce immediate-early gene transcription. *Neural Dev* 2007;2:1–21.
- [158] Kfoury N, Kapatos G. Identification of neuronal target genes for CCAAT/enhancer binding proteins. *Mol Cell Neurosci* 2009;40:313–27.
- [159] Damm J, Luheshi GN, Gerstberger R, Roth J, Rummel C. Spatiotemporal nuclear factor interleukin-6 expression in the rat brain during lipopolysaccharide-induced fever is linked to sustained hypothalamic inflammatory target gene induction. *J Comp Neurol* 2011;519:480–505.
- [160] Hansberg-Pastor V, Piña-Medina AG, González-Arenas A, Camacho-Arroyo I. C/EBPβ isoforms expression in the rat brain during the estrous cycle. *Int J Endocrinol* 2015;2015:1–7.
- [161] Nadeau S, Hein P, Fernandes KJL, Peterson AC, Miller FD. A transcriptional role for C/EBP beta in the neuronal response to axonal injury. *Mol Cell Neurosci* 2005;29:525–35.
- [162] Cardinaux JR, Allaman I, Magistretti PJ. Pro-inflammatory cytokines induce the

- transcription factors C/EBPbeta and C/EBPdelta in astrocytes. *Glia* 2000;29:91–7.
- [163] Yukawa K, Tanaka T, Tsuji S, Akira S. Expressions of CCAAT/Enhancer-binding proteins beta and delta and their activities are intensified by cAMP signaling as well as Ca²⁺/calmodulin kinases activation in hippocampal neurons. *J Biol Chem* 1998;273:31345–51.
- [164] Kovács KA, Steinmann M, Magistretti PJ, Halfon O, Cardinaux J-R. C/EBPbeta couples dopamine signalling to substance P precursor gene expression in striatal neurones. *J Neurochem* 2006;98:1390–9.
- [165] Sun W, Choi S-H, Park SK, Kim SJ, Noh MR, Kim EH, et al. Identification and characterization of novel activity-dependent transcription factors in rat cortical neurons. *J Neurochem* 2007;100:269–78.
- [166] Peña-Altamira E, Polazzi E, Moretto E, Lauriola M, Monti B. The transcription factor CCAAT enhancer-binding protein β protects rat cerebellar granule neurons from apoptosis through its transcription-activating isoforms. *Eur J Neurosci* 2014;39:176–85.
- [167] Ejarque-Ortiz A, Medina MG, Tusell JM, Pérez-González AP, Serratosa J, Saura J. Upregulation of CCAAT/enhancer binding protein beta in activated astrocytes and microglia. *Glia* 2007;55:178–88.
- [168] Cardinaux J-R, Magistretti PJ. Vasoactive intestinal peptide, pituitary adenylate cyclase-activating peptide, and noradrenaline induce the transcription factors CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP)-beta and C/EBP delta in mouse cortical astrocytes: involvement in cAMP-regulated glyco. *J Neurosci* 1996;16:919–29.
- [169] Straccia M, Gresa-Arribas N, Dentesano G, Ejarque-Ortiz A, Tusell JM, Serratosa J, et al. Pro-inflammatory gene expression and neurotoxic effects of activated microglia are attenuated by absence of CCAAT/enhancer binding protein β . *J Neuroinflammation* 2011;8:1–15.
- [170] Taubenfeld SM, Milekic MH, Monti B, Alberini CM. The consolidation of new but not reactivated memory requires hippocampal C/EBPbeta. *Nat Neurosci* 2001;4:813–8.
- [171] Garcia-Osta A, Tsokas P, Pollonini G, Landau EM, Blitzer R, Alberini CM. MuSK expressed in the brain mediates cholinergic responses, synaptic plasticity, and memory formation. *J Neurosci* 2006;26:7919–32.
- [172] Athos J, Impey S, Pineda V V, Chen X, Storm DR. Hippocampal CRE-mediated gene expression is required for contextual memory formation. *Nat Neurosci* 2002;5:1119–20.
- [173] Milekic MH, Pollonini G, Alberini CM. Temporal requirement of C/EBPbeta in the amygdala following reactivation but not acquisition of inhibitory avoidance. *Learn Mem* 2007;14:504–11.
- [174] Domizi P, Aoyama C, Banchio C. Choline kinase alpha expression during RA-induced neuronal differentiation: Role of C/EBP β . *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids* 2014;1841:544–51.
- [175] Ménard C, Hein P, Paquin A, Savelson A, Yang XM, Lederfein D, et al. An essential role for a MEK-C/EBP pathway during growth factor-regulated cortical neurogenesis. *Neuron* 2002;36:597–610.
- [176] Paquin A, Barnabé-Heider F, Kageyama R, Miller FD. CCAAT/enhancer-binding protein phosphorylation biases cortical precursors to generate neurons rather than astrocytes in vivo. *J Neurosci* 2005;25:10747–58.

- [177] Cortes-Canteli M, Pignatelli M, Santos A, Perez-Castillo A. CCAAT/enhancer-binding protein beta plays a regulatory role in differentiation and apoptosis of neuroblastoma cells. *J Biol Chem* 2002;277:5460–7.
- [178] Cortes-Canteli M, Aguilar-Morante D, Sanz-Sancristobal M, Megias D, Santos A, Perez-Castillo A. Role of C/EBP β transcription factor in adult hippocampal neurogenesis. *PLoS One* 2011;6:e24842.
- [179] Cortes-Canteli M, Luna-Medina R, Sanz-Sancristobal M, Alvarez-Barrientos A, Santos A, Perez-Castillo A. CCAAT/enhancer binding protein beta deficiency provides cerebral protection following excitotoxic injury. *J Cell Sci* 2008;121:1224–34.
- [180] Kapadia R, Tureyen K, Bowen KK, Kalluri H, Johnson PF, Vemuganti R. Decreased brain damage and curtailed inflammation in transcription factor CCAAT/enhancer binding protein beta knockout mice following transient focal cerebral ischemia. *J Neurochem* 2006;98:1718–31.
- [181] Oliva AA, Kang Y, Sanchez-Molano J, Furones C, Atkins CM. STAT3 signaling after traumatic brain injury. *J Neurochem* 2012;120:710–20.
- [182] Strohmeyer R, Shelton J, Loughheed C, Breitkopf T. CCAAT-enhancer binding protein- β expression and elevation in Alzheimer's disease and microglial cell cultures. *PLoS One* 2014;9:e86617.
- [183] Colangelo V, Schurr J, Ball MJ, Pelaez RP, Bazan NG, Lukiw WJ. Gene expression profiling of 12633 genes in Alzheimer hippocampal CA1: transcription and neurotrophic factor down-regulation and up-regulation of apoptotic and pro-inflammatory signaling. *J Neurosci Res* 2002;70:462–73.
- [184] Liu M, Hou X, Zhang P, Hao Y, Yang Y, Wu X, et al. Microarray gene expression profiling analysis combined with bioinformatics in multiple sclerosis. *Mol Biol Rep* 2013;40:3731–7.
- [185] Carro MS, Lim WK, Alvarez MJ, Bollo RJ, Zhao X, Snyder EY, et al. The transcriptional network for mesenchymal transformation of brain tumours. *Nature* 2010;463:318–25.
- [186] Homma J, Yamanaka R, Yajima N, Tsuchiya N, Genkai N, Sano M, et al. Increased expression of CCAAT/enhancer binding protein beta correlates with prognosis in glioma patients. *Oncol Rep* 2006;15:595–601.
- [187] Aguilar-Morante D, Cortes-Canteli M, Sanz-Sancristobal M, Santos A, Perez-Castillo A. Decreased CCAAT/enhancer binding protein β expression inhibits the growth of glioblastoma cells. *Neuroscience* 2011;176:110–9.
- [188] Boruk M, Savory JG, Haché RJ. AF-2-dependent potentiation of CCAAT enhancer binding protein beta-mediated transcriptional activation by glucocorticoid receptor. *Mol Endocrinol* 1998;12:1749–63.
- [189] Dong J, Tsai-Morris C-H, Dufau ML. A novel estradiol/estrogen receptor alpha-dependent transcriptional mechanism controls expression of the human prolactin receptor. *J Biol Chem* 2006;281:18825–36.
- [190] Zhang J, Gonit M, Salazar MD, Shatnawi A, Shemshedini L, Trumbly R, et al. C/EBP α redirects androgen receptor signaling through a unique bimodal interaction. *Oncogene* 2010;29:723–38.
- [191] Zha Q, Wang Y, Fan Y, Zhu M-Y. Dexamethasone-induced up-regulation of the human norepinephrine transporter involves the glucocorticoid receptor and increased binding of C/EBP- β to the proximal promoter of norepinephrine transporter. *J*

- Neurochem 2011;119:654–63.
- [192] Christian M, Pohnke Y, Kempf R, Gellersen B, Brosens JJ. Functional association of PR and CCAAT/enhancer-binding protein beta isoforms: promoter-dependent cooperation between PR-B and liver-enriched inhibitory protein, or liver-enriched activatory protein and PR-A in human endometrial stromal cells. *Mol Endocrinol* 2002;16:141–54.
- [193] Grimm SL, Seagroves TN, Kabotyanski EB, Hovey RC, Vonderhaar BK, Lydon JP, et al. Disruption of steroid and prolactin receptor patterning in the mammary gland correlates with a block in lobuloalveolar development. *Mol Endocrinol* 2002;16:2675–91.
- [194] Grimm SL, Contreras A, Barcellos-Hoff M-H, Rosen JM. Cell cycle defects contribute to a block in hormone-induced mammary gland proliferation in CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBPbeta)-null mice. *J Biol Chem* 2005;280:36301–9.
- [195] Mathelier A, Zhao X, Zhang AW, Parcy F, Worsley-Hunt R, Arenillas DJ, et al. JASPAR 2014: an extensively expanded and updated open-access database of transcription factor binding profiles. *Nucleic Acids Res* 2014;42:142–7.
- [196] Cartharius K, Frech K, Grote K, Klocke B, Haltmeier M, Klingenhoff A, et al. MatInspector and beyond: promoter analysis based on transcription factor binding sites. *Bioinformatics* 2005;21:2933–42.
- [197] Scott REM, Wu-Peng XS, Pfaff DW. Regulation and expression of progesterone receptor mRNA isoforms A and B in the male and female rat hypothalamus and pituitary following oestrogen treatment. *J Neuroendocrinol* 2002;14:175–83.
- [198] Murase R, Sumida T, Kawamura R, Onishi-Ishikawa A, Hamakawa H, McAllister SD, et al. Suppression of invasion and metastasis in aggressive salivary cancer cells through targeted inhibition of ID1 gene expression. *Cancer Lett* 2016;377:11–6.
- [199] Wagner CK, Pfau JL, De Vries GJ, Merchenthaler IJ. Sex differences in progesterone receptor immunoreactivity in neonatal mouse brain depend on estrogen receptor alpha expression. *J Neurobiol* 2001;47:176–82.
- [200] González-Arenas A, Cabrera-Wrooman A, Díaz N, González-García T, Salido-Guadarrama I, Rodríguez-Dorantes M, et al. Progesterone receptor subcellular localization and gene expression profile in human astrocytoma cells are modified by progesterone. *Nucl Recept Res* 2014;1:1–10.
- [201] Mantena SR, Kannan A, Cheon Y-P, Li Q, Johnson PF, Bagchi IC, et al. C/EBPbeta is a critical mediator of steroid hormone-regulated cell proliferation and differentiation in the uterine epithelium and stroma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:1870–5.
- [202] Bundy LM, Sealy L. CCAAT/enhancer binding protein beta (C/EBPbeta)-2 transforms normal mammary epithelial cells and induces epithelial to mesenchymal transition in culture. *Oncogene* 2003;22:869–83.
- [203] Peeper DS. C/EBP β : lost beyond translation. *EMBO J* 2011;30:3663–4.
- [204] Gomis RR, Alarcón C, Nadal C, Van Poznak C, Massagué J. C/EBPbeta at the core of the TGFbeta cytosstatic response and its evasion in metastatic breast cancer cells. *Cancer Cell* 2006;10:203–14.
- [205] Chen GK, Sale S, Tan T, Ermoian RP, Sikic BI. CCAAT/enhancer-binding protein beta (nuclear factor for interleukin 6) transactivates the human MDR1 gene by interaction with an inverted CCAAT box in human cancer cells. *Mol Pharmacol*

- 2004;65:906–16.
- [206] Tamura A, Hirai H, Yokota A, Sato A, Shoji T, Kashiwagi T, et al. Accelerated apoptosis of peripheral blood monocytes in Cebpb-deficient mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2015;464:654–8.
 - [207] Gade P, Roy SK, Li H, Nallar SC, Kalvakolanu D V. Critical Role for Transcription Factor C/EBP- β in Regulating the Expression of Death-Associated Protein Kinase 1. *Mol Cell Biol* 2008;28:2528–48.
 - [208] Riganti C, Kopecka J, Panada E, Barak S, Rubinstein M. The role of C/EBP- β LIP in multidrug resistance. *J Natl Cancer Inst* 2015;107:1–14.
 - [209] Wang W, Taylor RN, Bagchi IC, Bagchi MK. Regulation of human endometrial stromal proliferation and differentiation by C/EBP β involves cyclin E-cdk2 and STAT3. *Mol Endocrinol* 2012;26:2016–30.
 - [210] Bagchi MK, Mantena SR, Kannan A, Bagchi IC. Control of uterine cell proliferation and differentiation by C/EBPbeta: Functional implications for establishment of early pregnancy. *Cell Cycle* 2006;5:922–5.
 - [211] Guerra-Araiza C, Villamar-Cruz O, González-Arenas A, Chavira R, Camacho-Arroyo I. Changes in progesterone receptor isoforms content in the rat brain during the oestrous cycle and after oestradiol and progesterone treatments. *J Neuroendocrinol* 2003;15:984–90.
 - [212] González-Arenas A, Hansberg-Pastor V, Hernández-Hernández OT, González-García TK, Henderson-Villalpando J, Lemus-Hernández D, et al. Estradiol increases cell growth in human astrocytoma cell lines through ER α activation and its interaction with SRC-1 and SRC-3 coactivators. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* 2012;1823:379–86.
 - [213] Piwien-Pilipuk G, Van Mater D, Ross SE, MacDougald OA, Schwartz J. Growth hormone regulates phosphorylation and function of CCAAT/enhancer-binding protein beta by modulating Akt and glycogen synthase kinase-3. *J Biol Chem* 2001;276:19664–71.
 - [214] Kim J-W, Tang Q-Q, Li X, Lane MD. Effect of phosphorylation and S-S bond-induced dimerization on DNA binding and transcriptional activation by C/EBPbeta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:1800–4.
 - [215] Cardona-Gomez P, Perez M, Avila J, Garcia-Segura LM, Wandosell F. Estradiol inhibits GSK3 and regulates interaction of estrogen receptors, GSK3, and beta-catenin in the hippocampus. *Mol Cell Neurosci* 2004;25:363–73.
 - [216] Cohen AL, Colman H. Glioma biology and molecular markers. *Cancer Treat Res* 2015;163:15–30.
 - [217] Steinberg XP, Hepp MI, Fernández García Y, Suganuma T, Swanson SK, Washburn M, et al. Human CCAAT/enhancer-binding protein β interacts with chromatin remodeling complexes of the imitation switch subfamily. *Biochemistry* 2012;51:952–62.
 - [218] Eaton EM, Sealy L. Modification of CCAAT/enhancer-binding protein-beta by the small ubiquitin-like modifier (SUMO) family members, SUMO-2 and SUMO-3. *J Biol Chem* 2003;278:33416–21.
 - [219] Derer S, Berger S, Schlaeth M, Schneider-Merck T, Klausz K, Lohse S, et al. Oncogenic KRAS impairs EGFR antibodies' efficiency by C/EBP β -dependent suppression of EGFR expression. *Neoplasia* 2012;14:190–205.
 - [220] Williams CB, Soloff AC, Ethier SP, Yeh ES. Perspectives on epidermal growth

factor receptor regulation in triple-negative breast cancer: Ligand-mediated mechanisms of receptor regulation and potential for clinical targeting. *Adv Cancer Res* 2015;127:253–81.

- [221] Ai Z, Wang J, Wang Y, Lu L, Tong J, Teng Y. Overexpressed epidermal growth factor receptor (EGFR)-induced progestin insensitivity in human endometrial carcinoma cells by the EGFR/mitogen-activated protein kinase signaling pathway. *Cancer* 2010;116:3603–13.
- [222] Hatanpaa KJ, Burma S, Zhao D, Habib AA. Epidermal growth factor receptor in glioma: signal transduction, neuropathology, imaging, and radioresistance. *Neoplasia* 2010;12:675–84.
- [223] Erfani P, Tome-Garcia J, Canoll P, Doetsch F, Tsankova NM. EGFR promoter exhibits dynamic histone modifications and binding of ASH2L and P300 in human germinal matrix and gliomas. *Epigenetics* 2015;10:496–507.
- [224] Kostoro J, Chang S-J, Clark Lai Y-C, Wu C-C, Chai C-Y, Kwan A-L. Overexpression of vascular adhesion protein-1 is associated with poor prognosis of astrocytomas. *APMIS* 2016;124:462–8.

XII. Anexos

12.1. Artículos en revistas indizadas



CCAAT/enhancer binding protein β negatively regulates progesterone receptor expression in human glioblastoma cells



Valeria Hansberg-Pastor ^a, Aliesha González-Arenas ^b, Ignacio Camacho-Arroyo ^{c,*}

^a Facultad de Química, Departamento de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Mexico

^b Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, Mexico

^c Unidad de Investigación en Reproducción Humana, Instituto Nacional de Perinatología-Facultad de Química, UNAM, Ciudad de México, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 30 May 2016

Received in revised form

29 August 2016

Accepted 19 September 2016

Available online 20 September 2016

Keywords:

Progesterone receptor

Gene expression

Repressor

Cancer

Glioblastoma

CCAAT-enhancer binding protein beta

ABSTRACT

Many progesterone (P4) actions are mediated by its intracellular receptor (PR), which has two isoforms (PR-A and PR-B) differentially transcribed from separate promoters of a single gene. In glioblastomas, the most frequent and aggressive brain tumors, PR-B is the predominant isoform. In an *in silico* analysis we showed putative CCAAT/Enhancer Binding Protein (C/EBP) binding sites at PR-B promoter. We evaluated the role of C/EBP β in PR-B expression regulation in glioblastoma cell lines, which expressed different ratios of PR and C/EBP β isoforms (LAP1, LAP2, and LIP). CHIP assays showed a significant basal binding of C/EBP β , specific protein 1 (Sp1) and estrogen receptor alpha (ER α) to PR-B promoter. C/EBP β knockdown increased PR-B expression and treatment with estradiol (E2) reduced C/EBP β binding to the promoter and up-regulated PR-B expression. P4 induced genes were differently regulated when CEBP β was silenced. These data show that C/EBP β negatively regulates PR-B expression in glioblastoma cells.

© 2016 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Progesterone (P4) is a sex steroid hormone that regulates different processes in the central nervous system (CNS) such as sexual behavior, memory consolidation, cognitive functions, mood, neuronal damage protection, and tumors growth (Foy et al., 2010; McEwen, 2014; Piña-Medina et al., 2016). Many of these P4 actions occur through the interaction with its intracellular receptor (PR) (Blaustein, 2012; Hernandez-Hernandez et al., 2012), which is a ligand-dependent transcription factor that presents two isoforms (PR-A and PR-B) with different expression pattern, function, and regulation (Patel et al., 2015; Richer et al., 2002). The PR isoform ratio is essential for the specific P4 effects on a target tissue, and it is usually altered in neoplastic malignancies (Diep et al., 2015). In fact, PR isoforms are expressed differentially in human astrocytomas, the most frequent and aggressive brain tumors (Inoue et al., 2002; Khalid et al., 1997). These tumors are classified according to their molecular and histopathological features in four grades (I–IV), where grade IV, also known as glioblastoma, represents the leading cause of

death produced by a brain tumor (Schwartzbaum et al., 2006). Studies show that P4 promotes the proliferation, migration, and infiltration of human astrocytoma-derived cell lines through the activation of PR *in vitro* and *in vivo* (Germán-Castelán et al., 2014; González-Agüero et al., 2007; Piña-Medina et al., 2016). PR expression is directly related to the tumor evolution grade, and there is a predominance of PR-B in glioblastomas (González-Agüero et al., 2001; Khalid et al., 1997). The differential PR isoform expression in human astrocytomas suggests the existence of distinct molecular mechanisms that coordinate their particular transcription ratio.

The human PR isoforms are transcribed from a single gene (11q22–23) under the control of two distinct promoters, which are located at –711 to +31 bp (PR-B) and +464 to +1105 bp (PR-A) with respect to the transcription start site (+1) (Kastner et al., 1990). The transcriptional regulation of human PR isoforms has been studied as a classical estradiol (E2)-induced gene. In MCF7 and T47D breast cancer cells, the E2-induced PR expression occurs through the direct or indirect binding of its intracellular receptor (ER) to the regulatory regions of the PR gene (Petz et al., 2004; Petz and Nardulli, 2000). ER indirect binding occurs through its interaction with transcription factors such as Sp1 and activator protein 1 (AP-1) (Safe and Kim, 2008). The PR gene has different

* Corresponding author.

E-mail address: camachoarroyo@gmail.com (I. Camacho-Arroyo).

functionally characterized transcription binding sites for these factors in its promoters. PR-A promoter has a half-estrogen response element (ERE) near two Sp1 sites and a more proximal AP-1 site. In contrast, PR-B promoter lacks EREs but has two functional Sp1 binding sites (−61 to −53 and −49 to −41) that are located near a conserved CCAAT box (−70 to −66) (Kastner et al., 1990; Petz et al., 2004; Petz and Nardulli, 2000; Schultz et al., 2003). In particular, for PR-B promoter, ER α induces Sp1 binding to its recognition sites; the proximal Sp1 site binds more efficiently to Sp1 and is a more potent E2-induced transcriptional enhancer than the distal site (Schultz et al., 2003). The differential PR isoforms expression could also be mediated by other transcription factors such as the CCAAT/enhancer-binding proteins (C/EBP).

The C/EBP family of transcription factors consists of six members (C/EBP α -C/EBP ζ) that have a highly conserved C-terminal basic-leucine zipper (bZIP) domain formed by the leucine zipper dimerization domain and the basic DNA binding region (Ramji and Foka, 2002). These transcription factors were first described to interact with the CCAAT box motif of some rat liver gene promoters and to some viral enhancer core sequences (Landschulz et al., 1989; Schwartz et al., 2000). It is now recognized that the C/EBP factors bind as dimers to the DNA consensus sequence TT^G/A₁CGTAA to regulate gene expression. However, they can dimerize with each other or with other bZIP proteins resulting in variations in binding sites specificity (Osada et al., 1996; Tsukada et al., 2011; Zahnov, 2009). Within the C/EBP family, the isotypes β and δ are the most abundant ones in the brain and they are expressed both in neurons and astrocytes. However, C/EBP α and γ have also been identified in the CNS (Calella et al., 2007; Pulido-Salgado et al., 2015).

C/EBP β is involved in diverse CNS functions such as cell proliferation, differentiation, and survival (Cortes-Canteli et al., 2011; Peña-Altamira et al., 2014). It has also been related to certain pathologies such as Alzheimer disease, multiple sclerosis and even brain tumors (Carro et al., 2010; Homma et al., 2006; Strohmeier et al., 2014). C/EBP β has three isoforms translated from a single mRNA by the alternative use of three different AUG initiation codons within the same open reading frame. C/EBP β isoforms were initially identified in the liver and thus known as LAP1 (48 kDa) and LAP2 (45 kDa), for liver activation proteins, and LIP (20 kDa), for liver inhibitory protein (Calkhoven et al., 2000; Tsukada et al., 2011). LAP2 is suggested to be the most transcriptional active isoform, whereas LIP, which lacks the N-terminal transactivation domains, is frequently recognized as a dominant negative (Pulido-Salgado et al., 2015; Zahnov, 2009). Nevertheless, the transcriptional potential of these isoforms depends on the LAP/LIP ratio (LAP1+LAP2/LIP), which is important to determine a specific cell fate (Savic et al., 2015).

C/EBP β and PR interactions have been reported to occur at different levels: PR induces C/EBP β expression in mice uterine epithelial cells (Mantena et al., 2006) and PR-B induces C/EBP β expression in breast cancer cells (Richer et al., 2002), while both proteins interact to induce the expression of PR or C/EBP β target genes in human endometrial stromal cells (Christian et al., 2002). C/EBP β has been reported to bind to the second intron of PR gene (Clementi et al., 2013), but until now there are no reports of the direct role of C/EBP β in PR gene expression. In this work, an *in silico* analysis shows that PR-B, but not PR-A promoter, has three putative C/EBP binding sites, suggesting an important role of this family of transcription factors in regulating the differential expression of PR isoforms. Since C/EBP β is expressed in the CNS and brain tumors (Homma et al., 2006; Sterneck and Johnson, 1998) we studied its role in the regulation of PR-B expression in human glioblastoma cells.

2. Material and methods

2.1. *In silico* analysis

For the *in silico* analysis of human PR core promoter region, the sequence (10113074–101128441 bp) located in chromosome 11q22-q23 was obtained from the NCBI database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5241>) and determined as reported by Kastner et al. (1990). The sequence was analyzed using the databases JASPAR (<http://jaspar.genereg.net/>) (Mathelier et al., 2014) and TRANSFAC Public 6.0 (<http://www.gene-regulation.com/index2>), and the MatInspector tool from Genomatix Software GmbH (<https://www.genomatix.de/>) (Cartharius et al., 2005) to predict C/EBP transcription factor binding sites. The matrix similarity score was ranked as >0.80 and the putative sites were considered positive only if predicted by at least two of the software.

2.2. Cell culture and treatments

Human glioblastoma-derived cell lines (U251 and U87 purchased from ATCC, USA; and D54 obtained by Dr. Andrés Gutiérrez from Dr. Sontheimer, Birmingham, AL) and human embryonic kidney cells, HEK293T (ATCC, USA) were grown in high-glucose DMEM medium (Biowest, USA), while breast cancer cells T47D (ATCC, USA) were grown in RPMI medium (In vitro S.A., MEX). Both media were supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 1 mM pyruvate and 0.1 mM non-essential amino acids (Biowest, USA) and cells were maintained at 37 °C under a 95% air and 5% CO₂ atmosphere. For hormone treatments, control and knockdown cells were grown in phenol red-free DMEM (In Vitro S.A., MEX) supplemented with 10% charcoal stripped FBS (GeneTex, USA) for 24 h and then treated with vehicle (V, 0.02% cyclodextrin), P4 (10 nM) for 6 h or E2 (10 nM) for 24 h; all hormones were purchased from Sigma-Aldrich (USA). For the ChIP analysis, cells were treated with 10 nM E2 for 3, 6, 9, 12, 24 and 48 h.

2.3. Western blot

Samples were homogenized in RIPA lysis buffer with an added protease inhibitor cocktail (p8340, Sigma-Aldrich, USA), and total proteins were obtained by centrifugation at 14,000g, at 4 °C for 15 min and quantified using a NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific, USA). 70 μ g of total proteins were separated on a 7.5% (for PR) or 12% (for C/EBP β) SDS-PAGE at 20 mA; and transferred to nitrocellulose membranes (Millipore, USA) at 35 mA in semi-dry conditions at room temperature for 1 h for C/EBP β and 7 h for PR. Membranes were blocked with 3% nonfat dry milk and 1% bovine serum albumin at 37 °C under constant agitation for 2 h and then incubated with a rabbit monoclonal antibody that recognizes the three C/EBP β isoforms (0.6 μ g/mL; ab32358 [E299], Abcam, ENG) or a mouse monoclonal antibody against both PR isoforms (3.3 μ g/mL; ab58565 [N559]; Abcam, ENG) at 4 °C for 48 h. Afterward, blots were incubated with anti-rabbit or anti-mouse secondary antibodies (1:7500 and 1:5000, respectively) conjugated to horseradish peroxidase (Santa Cruz Biotechnology, USA) at room temperature for 45 min. To correct for differences in the amount of total protein loaded in each lane, PR or C/EBP β isoforms content was normalized to that of α -tubulin. Blots were stripped with glycine (0.1 M, pH 2.5) at room temperature for 30 min and incubated with 0.2 μ g/mL of mouse monoclonal anti- α -tubulin antibody (sc-5286 [B-7], Santa Cruz Biotechnology, USA) at 4 °C overnight. Blots were then incubated with a 1:5000 dilution of goat anti-mouse IgG conjugated to horseradish peroxidase (Santa Cruz Biotechnology, USA) at room temperature for 45 min. Chemiluminescence signals were detected exposing membranes to

Kodak Biomax Light Films (Sigma-Aldrich, USA) using the Super-signal West Femto as peroxidase substrate (Thermo Scientific, USA). The antigen-antibody complex was detected as the area under a peak corresponding to a band density (the area is given in inches with a default scale of 72 pixels/inch) in a semiquantitative way using a 14.1 megapixels digital Canon camera (SD1400IS, Canon, MEX) and the ImageJ 1.45S software (National Institutes of Health, USA). In order to minimize assay variations, all western blots were carried out in parallel.

2.4. RNA isolation and RT-qPCR

Cells were washed and lysed using a guanidine isothiocyanate solution, and total RNA was isolated as instructed by the RNeasy Mini Kit (Qiagen, USA). One μg of total RNA was used for cDNA synthesis, which was carried out using the M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen, USA) and oligo dT₁₈ primers (Sigma-Aldrich, USA) according to the manufacturer's protocol. After incubation, 2 μL of RT reaction were amplified by qPCR in a LightCycler 1.5 instrument (Roche, USA) using the FastStart DNA Master SYBR Green 1 kit (version 18; Roche, USA) according to the manufacturer's protocol (10 min incubation at 95 °C followed by 45 cycles of 10 s at 95 °C, 10 s at 60 °C and 10 s at 72 °C; final incubation for 30 s at 40 °C). The primers used for the amplification of each gene are listed in Table 1.

2.5. Chromatin immunoprecipitation

U251 cells grown in 10 cm dishes to an 80–90% confluence were fixed with 1% formaldehyde for 10 min at room temperature under constant agitation, and 0.125 M glycine was added for 5 min to stop crosslinking. Cells were rinsed with a cold phosphate-buffer saline (PBS) solution with 1 mM PMSF, collected by scraping and lysed with 1 mL lysis buffer (50 mM Tris pH 8.0, 1% SDS, 10 mM EDTA) with a protease inhibitor cocktail (p8340, Sigma-Aldrich, USA). Cells were disrupted through chromatin shearing with an Ultrasonic Processor instrument (GEX 130; CTR Scientific, MEX) for 2.5 min (with cycles of 10 s on/30 s off) with a 75% amplitude (microtip diameter: 2 mm) to obtain DNA fragments with a median size of 500 bp. Cell lysates were centrifuged at 9000g for 10 min at 4 °C, the supernatant was diluted 10 times with dilution buffer (16.7 mM Tris-HCL pH 8.0, 167 mM NaCl, 1.2 mM EDTA, 1.1% Triton X-100, 0.01% SDS), 1% of the sample was kept apart as the Input sample and the rest incubated overnight with 2–4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of the respective polyclonal antibodies: C/EBP β (sc-150 [C-19]), Sp1 (sc-14027 [H-225]) and ER α (sc-7207 [H-184]; Santa Cruz Biotechnology, USA). Positive (acetylated H3; 06–599, Millipore, USA) and

negative controls (agarose beads only, No antibody) were included in each experiment. Samples were incubated with A/G-Plus agarose beads (sc-2003, Santa Cruz Biotechnology, USA) under constant agitation for 1 h at 4 °C, and centrifuged at 1000g for 2 min; beads were washed with 1 mL of low salt buffer, 1 mL of high salt buffer, 1 mL of LiCl buffer and two times with 1 mL of TE buffer (10 mM Tris, 0.1 mM EDTA, pH 8.0). Immunocomplexes were eluted (1% SDS, 100 mM NaHCO₃) from the agarose beads and incubated with RNase A (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$; Sigma-Aldrich, USA) for 30 min at 37 °C. Crosslinks were reversed by overnight incubation with Proteinase K (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Sigma-Aldrich, USA) at 55 °C. The DNA was purified using phenol-chloroform-isoamyl alcohol (25:24:1; Sigma-Aldrich, USA) and amplified by qPCR in a LightCycler 1.5 instrument (Roche, USA) using the FastStart DNA Master SYBR Green 1 kit (version 18; Roche, USA) according to the manufacturer's protocol. The primers we designed for PR-B promoter region amplification were: FW: 5'-AGCCAAATGTCTTCTCTGTG-3', and RV: 5'-CCCACACGCACAATA-CAAC-5'.

2.6. Lentivirus production and cell infection

Lentivirus production was carried out according to the pLenti Lentivirus Production kit protocol (ATCGbio Life Technology, CAN). Briefly: HEK293T cells were grown in 10 cm dishes and then transferred to 6-well plates previously treated with the supplied coating solution. Following the attachment of cells, 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of control or C/EBP β plasmids (carrying a shRNA) were used to transfect the cells. After 4 h of incubation, the transfection medium was changed with the provided lentiviral production medium and cells were incubated at 37 °C. Two days after transfection, medium rich in lentiviral particles was collected, centrifuged at 9000g for 5 min and filtered through a PDVF syringe filter (0.22 μm ; Millipore, USA). 100 μL of filtered lentiviruses were used to infect U251 and U87 cells, previously grown in 6-well plates to a 30% confluence with 2 mL DMEM. Glioblastoma cells were infected for 72 h, and hygromycin (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) was added to select the transfected cells for the last 12 h. Afterward, the medium was changed for DMEM supplemented with 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of hygromycin in order to grow infected cells for further use in Western blot and RT-qPCR analyses.

2.7. Immunofluorescence

Infected U251 cells were fixed for 20 min in 4% paraformaldehyde solution, washed three times with PBS and permeabilized with 100% methanol for 6 min at –20 °C. The fixed cells were blocked with 5% Normal Goat Serum in PBS-Tween 0.1% for 1 h at 37 °C and incubated with 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ rabbit polyclonal antibody anti-PR (sc-539 [C-20], Santa Cruz Biotechnology, USA) under constant agitation at 4 °C for 12 h. Cells were rinsed three times with PBS for 10 min each and incubated in the dark with a goat anti-rabbit FITC-labeled secondary antibody (1:500, sc-2012; Santa Cruz Biotechnology, USA) at room temperature for 2 h. Nuclei were stained with 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Hoechst 33342 solution (Thermo Scientific, USA) and mounted with fluorescence mounting medium (Bioscience Medical, CA, USA). Samples were visualized under an Olympus Bx43F microscope with a 600X magnification (numerical aperture 1.25, Olympus, USA) to detect the fluorescence, and 5 random fields were captured with the MicroPublisher Real Time Viewing 5.0 camera (QIMAGING, CAN) using the Image-Pro Plus 7.0 program (MediaCybernetics, Inc., USA). For each field, the fluorescence of at least 15 cells and the background signal were measured using the ImageJ 1.45S program (National Institutes of Health, USA) to obtain the corrected total cell fluorescence (CTCF). Negative controls consisted of cells in which the primary antibody was omitted and they had no detectable signal (data not shown).

Table 1
The designed primers used for amplifying different genes by RT-qPCR.

Gene	Primers	Fragment (bp)
C/EBP β	FW: 5'-ACAGCGACGAGTACAAGATCC-3' RV: 5'-GCAGCTGCTTGAACAAGTTCC-3'	195
Total PR (PR-A+PR-B)	FW: 5'-ACATGGTAGCTGTGGGAAGG-3' RV: 5'-GCTAAGCCAGCAAGAAATGG-3'	202
PR-B	FW: 5'-TGTTGTATTTGTGCGTGTGG-3' RV: 5'-ACCTCTCGGTACAGCCATT-3'	192
VAP-1	FW: 5'-CAGGGACACTGAACCTTGT-3' RV: 5'-CCTTCCAGCTCAGCTATGG-3'	233
Cyclin D1	FW: 5'-TGATAACCTGAGCGGTGG-3' RV: 5'-TCTCCGAGACGCCCTCTTT-3'	146
EGFR	FW: 5'-GCCTGACTGAGACAGCAT-3' RV: 5'-TGGTACTGTGGTCTCTGCT-3'	152
18S	FW: 5'-CGCGTTTCTATTTTGTGGT-3' RV: 5'-GTCGGCATGTTTATGGTC-3'	218

Note: FW = forward primer, RV = reverse primer.

2.8. Statistical analysis

All data were analyzed and plotted using the GraphPad Prism 6.0e program (GraphPad Software, Inc., USA). A statistical analysis between comparable groups was performed using either one-way (ChIP assays) or two-way ANOVA (Western blot) followed by a Tukey's multiple comparisons test with a confidence interval of 95%. mRNA levels of lentiviral infected cells without treatment and immunofluorescence CTCF values were analyzed by an unpaired *t*-test. A value of $P < 0.05$ was considered statistically significant as stated in figure legends.

3. Results

3.1. The promoter of progesterone receptor isoform B has three putative C/EBP binding sites

The human PR gene is classically regulated by E2 in different tissues, including the brain, and under pathological conditions such as breast and brain cancer (Cabrera-Muñoz et al., 2009; Jacobsen et al., 2005; Scott et al., 2002). In human astrocytomas, PR expression increases according to the tumor evolution grade and PR-B is the predominant isoform in high-grade astrocytomas (González-Agüero et al., 2001; Khalid et al., 1997), which highlights the importance of studying possible transcription factors that could regulate this differential expression. One of them is the family of transcription factors known as C/EBP, which comprises six different isotypes. The sequence of PR core promoter, as described by Kastner et al. (1990) (Fig. 1A and B), was used for an *in silico* analysis using different bioinformatic tools (JASPAR, TRANSFAC, and MatInspector) to find putative C/EBP binding sites. According to the analysis, we found that only PR-B promoter has three putative C/EBP sites (site 1: 5'-CATTCT-TAAGACA-3' from -546 to -532, site 2: 5'-TTTTCCAATTAGATA-3' from -218 to -203, and site 3: 5'-ATTTGCAAAACA-3' from -189

to -177) predicted by at least two of the used software (Fig. 1C). All three tools predicted the third site towards the 3'-end (-189 to -177), which suggests a strong putative C/EBP binding site. Near this third site, there are two Sp1 binding sites which have been previously reported to be essential for the E2-induced transcription and a conserved CCAAT box (Schultz et al., 2003) (Fig. 1C). The clear difference in the distribution of C/EBP binding sites between the two promoters led us to study these factors, with a particular approach in C/EBP β and its role in PR-B expression regulation.

3.2. PR and C/EBP β isoforms are differentially expressed in glioblastoma cell lines

C/EBP β is expressed in astrocytes and different brain regions of the rat, and it has been reported to be expressed in human astrocytomas (Hansberg-Pastor et al., 2015; Homma et al., 2006; Pulido-Salgado et al., 2015). We first studied if the human astrocytoma cell lines U251, D54 and U87 express both C/EBP β and PR isoforms. Western blot analysis showed that these proteins are expressed in all three cell lines, with different isoform ratios. For PR, we found that PR-B content is higher than that of PR-A in U251 (3:1) and U87 (2:1) cells as determined by their PR-B/PR-A ratio, while D54 shows a similar proportion of both isoforms (Fig. 2A) as previously reported by our group (Hansberg-Pastor et al., 2013). Breast cancer cells T47D, which expresses high and equivalent levels of PR isoforms (Murase et al., 2016; Yu et al., 2013), were used as a positive control. Concerning C/EBP β isoforms, the three cell lines present a higher content of LAP2 compared to the other two isoforms. Interestingly, U251 had a greater content of LIP that reduced its LAP/LIP ratio to 2:1; U87 LAP1 content is significantly higher than that of LIP increasing the LAP/LIP ratio to 7:1 while D54 cells showed a LAP/LIP ratio of 3:1. (Fig. 2B). Hence, U251 and U87 had the lowest and highest LAP/LIP ratio, respectively.

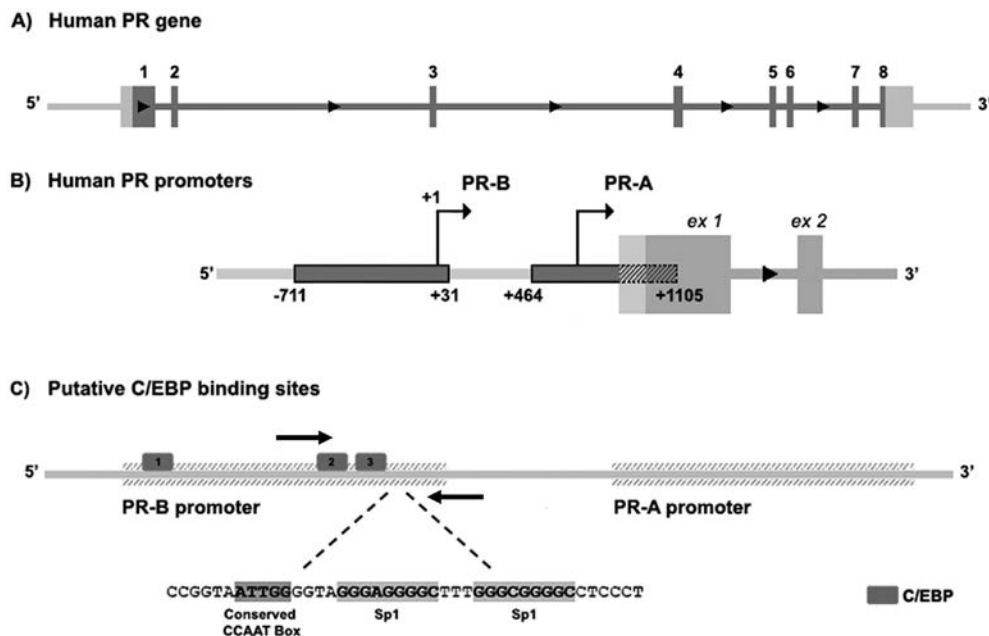


Fig. 1. *In silico* analysis of the human PR promoter region. **A)** Human PR gene as obtained from the NCBI database; its eight exons are numbered. **B)** PR promoter region with the transcription start site for each isoform and the length of each promoter determined as of the +1 nucleotide as described by Kastner et al. (1990). Exons (ex) 1 and 2 are shown. **C)** *In silico* analysis for putative C/EBP binding sites that were predicted by at least two of the following databases: TRANSFAC, JASPAR, and MatInspector. Three sites are located in PR-B promoter only (numbered rectangles). The sites 2 and 3 are located near a conserved CCAAT box and two previously reported Sp1 binding sites as shown in the amplified sequence, the arrows show the site of the primers used for the ChIP assays.

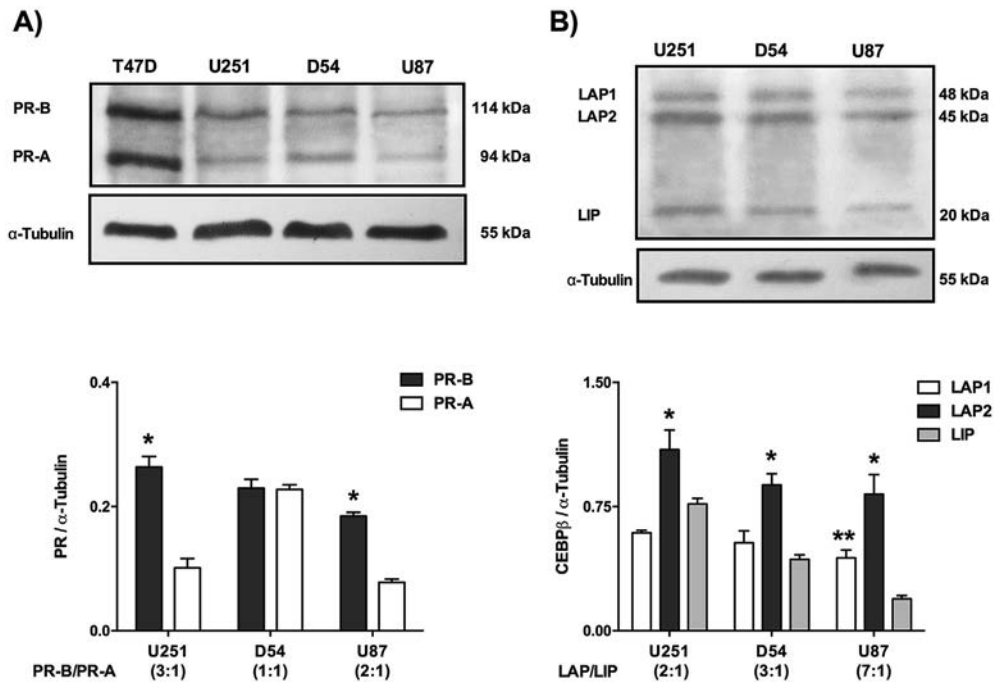


Fig. 2. PR and C/EBP β isoforms expression in human glioblastoma cell lines. **A)** PR isoforms content analyzed by western blot in T47D (positive control), U251, D54 and U87 cells. **B)** C/EBP β isoforms LAP1, LAP2 and LIP content in astrocytoma cells. In **A)** and **B)** a representative blot image and the corresponding densitometric analysis for the expression of PR and C/EBP β isoforms in astrocytoma cells are shown. **A)** * P < 0.01 vs. PR-A in U251 and U87 cells, mean \pm S.E.M., n = 5. **B)** * P < 0.01 vs. LAP1 and LIP, ** P < 0.05 vs. LIP in U87 cells, mean \pm S.E.M., n = 3.

3.3. C/EBP β , Sp1, and ER α are bound to the promoter of PR-B

Once the cell lines under study were characterized for C/EBP β and PR expression, we then analyzed if C/EBP β could bind to the designated PR-B promoter region that comprises the two putative C/EBP sites located near the CCAAT box and the previously reported Sp1 sites (see arrows in Fig. 1C). We chose U251 cell line for these studies given its high PR-B content. The immunoprecipitation of C/EBP β isoforms required for the ChIP assays was evaluated by Western blot using cross-linked chromatin. As shown, both the LAP proteins and LIP were immunoprecipitated when compared to the total chromatin used as input (Fig. 3A) indicating the capability of all three C/EBP β isoforms to bind the DNA.

Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assays were performed on the described PR-B promoter region in U251 cells. The ChIP assays for C/EBP β showed that this transcription factor binds the PR-B promoter region under basal conditions (Fig. 3B). Nevertheless, these studies are unable to provide the information about the particular C/EBP β dimer bound to the promoter. Given that the studied promoter region contains two previously reported Sp1 sites through which ER α induces PR-B expression (Schultz et al., 2003), we also performed ChIP assays for both transcription factors. Sp1 binds to PR-B promoter in the absence of a hormonal stimulus and, surprisingly, ER α also did (Fig. 3B), possible by interacting with Sp1. These data suggest that without a specific hormonal stimulus, the three transcription factors are bound to PR-B promoter region.

3.4. C/EBP β negatively regulates PR-B expression in U251 cells

The ChIP assays showed that C/EBP β , Sp1, and ER α are bound to PR-B promoter region; hence we further evaluated the role of C/EBP β in PR-B expression regulation. For this purpose, we silenced C/EBP β with a lentivirus carrying a shRNA against its mRNA (Lv-CEBP β) and assessed PR mRNA and protein levels. To have a better

understanding of C/EBP β mediated transcription, we used the cell lines U251 and U87, since both present high levels of PR-B as well as the lowest and highest LAP/LIP ratio, respectively. Nevertheless, U87 cells were very sensitive to C/EBP β knockdown (almost all cells died) compared to U251 cells (Supplementary Figure 1), suggesting an important role for this protein in cell survival in specific cell contexts. In U251 cells, we achieved a 60% reduction of C/EBP β mRNA compared to the control lentivirus (Lv-Control) that carries a shRNA that has no functional target (Fig. 4A), and at the protein level we observed a 60–75% reduction of isoforms content, and particularly LIP was significantly affected (Fig. 4A). Infected U251 cells were used to evaluate PR expression, and we found a significant increase in the expression of total PR (PR-A+PR-B) and of PR-B (Fig. 4B). Interestingly, the data show that the observed increase is clearly due to PR-B and not to PR-A. This effect was also observed at the protein level where PR-B is significantly increased (1.5 fold) when C/EBP β is silenced, while PR-A content showed a slight increase that was not statistically significant (Fig. 4C). To further corroborate the data, immunofluorescence assays were done in U251 infected cells. As shown in Fig. 4D, PR is located in the cytoplasm and nuclei of the cells, as previously reported in other human astrocytoma cell lines (González-Arenas et al., 2015). In the immunofluorescence assays a significant increase in PR expression (Fig. 4D) and nuclear localization is observed when C/EBP β is silenced. The increase at the protein level observed by Western blot and immunofluorescence is 1.5 fold above the control condition. These data suggest that C/EBP β negatively regulates PR-B expression.

3.5. E2 modulates C/EBP β negative regulation of PR expression

C/EBP β binds to PR-B promoter and silencing this protein increases the expression of the latter, suggesting a repressive role in the regulation of PR expression. We, therefore, evaluated the role of

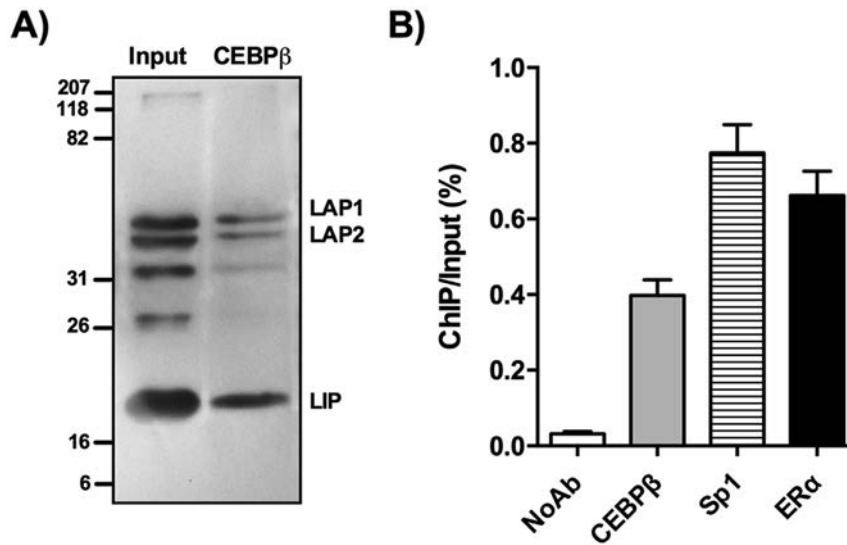


Fig. 3. ChIP assays for PR-B promoter in U251 cells. Cells were grown in phenol red-free DMEM media with 10% FBS until a 90% confluence, and then chromatin was cross-linked with 1% formaldehyde. **A)** Cross-linked chromatin immunoprecipitated against C/EBP β followed by Western blot to evaluate the DNA bound isoforms. The samples were boiled for 10 min to disrupt the crosslinks. The figure shows a representative image of three independent experiments. **B)** ChIP assays for the transcription factors C/EBP β , Sp1 and ER α in PR-B promoter region. The data represent the percentage of the relative transcription factor enrichment with respect to the input (ChIP/Input). A negative control group without antibody (NoAb) was included for comparison. Mean \pm S.E.M, n = 6.

C/EBP β in PR-B expression under an E2 stimulus, which is a classical PR expression inducer (Cabrera-Muñoz et al., 2009; Wagner et al., 2001). We first studied if basal C/EBP β binding to PR-B promoter changed when treated with E2 (10 nM) using ChIP assays, and we found that C/EBP β partially dissociates from the promoter (Fig. 5A) from 3 to 48 h after treatment. This reduced association is significantly different when compared to the vehicle-treated cells, suggesting that C/EBP β is removed from PR-B promoter when stimulated with E2. To further study the negative role of C/EBP β in PR expression, we treated infected U251 cells with E2 for 24 h and evaluated PR expression. We observed that in the Lv-Control cells treated with E2, total PR as well as PR-B expression significantly increased when compared to the vehicle-treated cells, corroborating the inducing effect of E2 (Fig. 5B). Silencing of C/EBP β increased PR basal expression as expected (Figs. 4B and 5B) and, interestingly, total PR and PR-B expressions are increased upon E2 stimulation when compared to the vehicle (Fig. 5B), but this increase is not larger than the one observed in the Lv-Control condition. We also evaluated the expression levels of C/EBP β under a hormonal stimulus, and we found that E2 positively regulates its expression, but it is lost when C/EBP β is silenced (Fig. 5C). Despite the increase of C/EBP β expression after E2 treatment, there is a reduced contact with PR-B promoter, which suggests possible chromatin conformation changes that inhibit this interaction. These data suggest that C/EBP β acts as a repressor of PR-B expression and its absence from the promoter is important for the E2-dependent induction.

3.6. P4 regulates target genes in C/EBP β knockdown cells

C/EBP β knockdown promotes an increase in PR expression, particularly in PR-B. In order to evaluate the effect of C/EBP β on PR function in glioblastoma cells, we decided to study the expression of P4 target genes such as cyclin D1, epidermal growth factor receptor (EGFR) and the vascular adhesion protein 1 (VAP-1) (González-Arenas et al., 2014; Hernandez-Hernandez et al., 2012) by RT-qPCR in infected U251 cells. As shown in Fig. 6, the expression of all three genes significantly increased after 6 h of P4 treatment (10 nM) in control cells (Lv-Control) when compared to the

vehicle (V) treatment, corroborating their P4-induced expression. Silencing of C/EBP β promoted a significant increase in cyclin D1 and EGFR expression without a hormonal stimulus when compared to the vehicle-treated Lv-Control cells. However, when treated with P4, cyclin D1 expression did not further increase and that of EGFR significantly decreased when compared to the vehicle-treated Lv-CEBP β cells (Fig. 6A and B). Interestingly, in vehicle treated Lv-CEBP β cells VAP-1 expression exhibited a tendency to increase compared to the Lv-Control cells although not statistically significant and it maintained the P4-dependent induction (Fig. 6C). Also, C/EBP β gene expression was not modified after 6 h of P4 treatment (Supplementary Figure 2) indicating that lentiviral knockdown is sufficient to decrease C/EBP β levels even in the presence of P4. As in the case of breast cancer cells, PR is degraded in a ligand-dependent manner after 5–6 h post-treatment (González-Arenas et al., 2015; Lange et al., 2000), which should not interfere with the gene expression analysis.

4. Discussion

In this work, we studied the role of C/EBP β in the regulation of PR-B expression in human glioblastoma cells. In previous studies, an interplay between PR and C/EBP β has been observed: PR activation induces C/EBP β expression in mice uterine epithelial cells (Mantena et al., 2006) and in breast cancer cells (Richer et al., 2002), and in human endometrial stromal cells PR-A interacts with LAP isoforms to regulate C/EBP β target genes, while PR-B interacts with LIP at the protein level to modulate the expression of PR target genes (Christian et al., 2002). Also, C/EBP β has been reported to bind to the second intron of PR gene in human endometrial stromal cells (Clementi et al., 2013), but there are no reports of the direct role of this transcription factor in PR gene expression regulation. PR isoforms ratio determines P4 actions on specific tissues and it is frequently altered in several cancers such as breast, endometrial, and brain cancer (González-Agüero et al., 2001; Kreizman-Shefer et al., 2014; Wargon et al., 2015). In human high-grade astrocytomas, a predominance of PR-B has been observed (González-Agüero et al., 2001; Khalid et al., 1997), and we now suggest the participation of C/EBP β in this differential

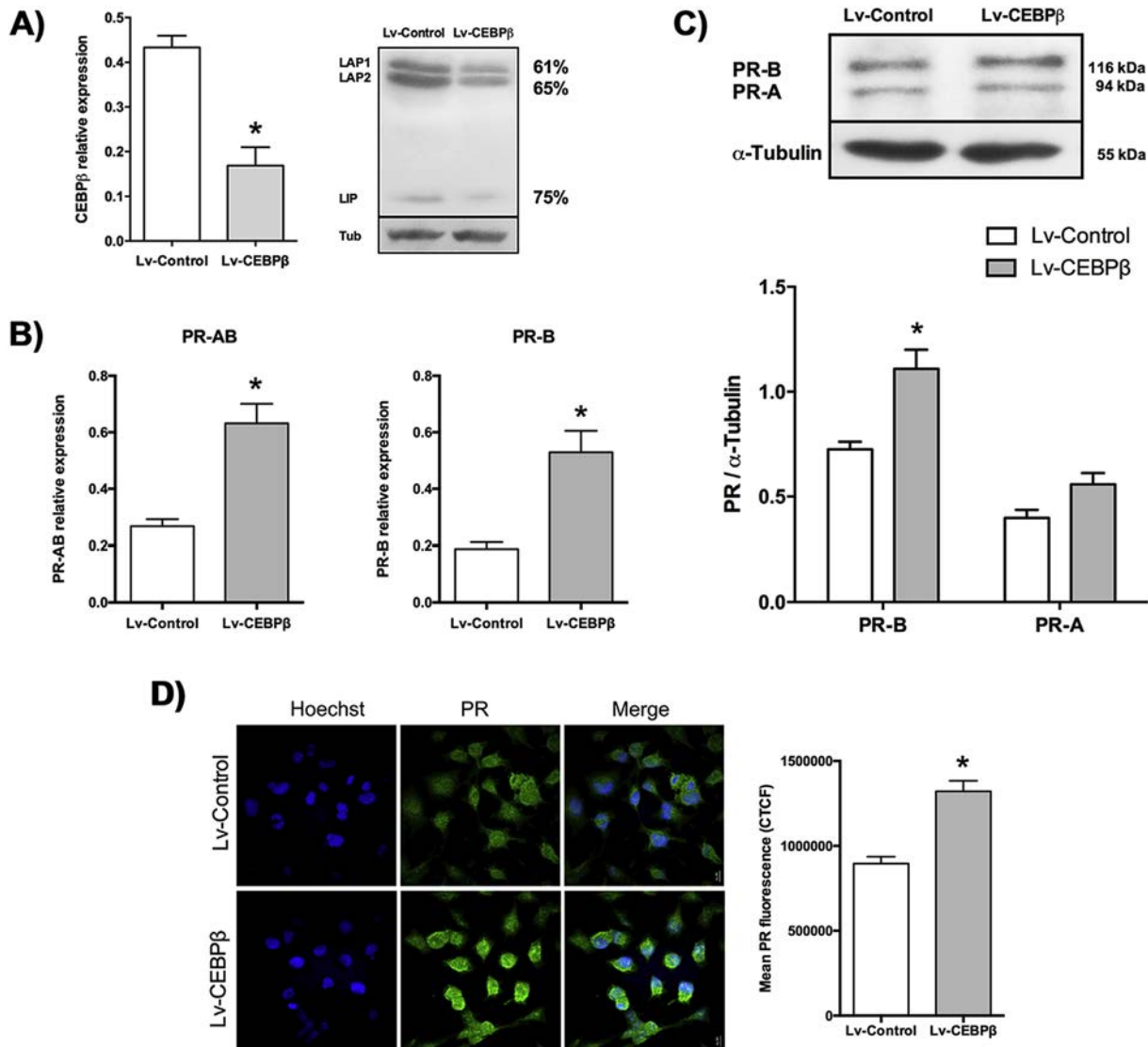


Fig. 4. Knockdown of *C/EBPβ* induces PR expression. **A)** U251 cells were infected with a control lentivirus (Lv-Control) and a lentivirus carrying a shRNA against *C/EBPβ* (Lv-CEBPβ). After infection cells were grown in phenol red-free DMEM with 10% FBS and hygromycin to evaluate *C/EBPβ* and PR expression. Silencing *C/EBPβ* reduces its mRNA (* $P < 0.01$ vs. Lv-Control, mean \pm S.E.M., $n = 5$.) and protein levels ($n = 5$). **B)** RT-qPCR for total PR (PR-AB) and PR-B in U251 infected cells. * $P < 0.01$ vs. Lv-Control, mean \pm S.E.M., $n = 4$. **C)** Western blot for PR isoforms in U251 cells with silenced *C/EBPβ*. * $P < 0.001$ vs. Lv-Control, mean \pm S.E.M., $n = 3$. **D)** Immunofluorescence for PR in Lv-Control and Lv-CEBPβ infected U251 cells. Nuclei are stained in blue with Hoechst 33342 and PR is marked in green, the merged images are shown. The corrected total cell fluorescence (CTCF) was obtained by measuring the fluorescence from at least 15 cells from 5 random fields captured for each condition. * $P < 0.001$ vs. Lv-Control, mean \pm S.E.M., $n = 2$. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

expression regulation.

C/EBPβ appears to be fundamental for glioma cell survival since, in GL261 murine glioma cells, silencing of *C/EBPβ* reduces their proliferation (Aguilar-Morante et al., 2011). Interestingly, the LAP/LIP ratio changes depending on the cell context, and it has been reported to be relevant for cancer development and progression (Saint-Auret et al., 2011; Zahnov, 2009). LAP2 has been shown to regulate genes involved in cell proliferation and migration (Bundy and Sealy, 2003; Eaton et al., 2001). Besides, LIP expression deregulation has been related to a susceptibility to tumorigenesis (Bégay et al., 2015). The differences in the LAP/LIP ratio observed in the studied cell lines suggest differences in *C/EBPβ* translation regulation as well as in the regulation of target gene expression.

PR gene promoter region has different regulatory sites implicated in the E2-dependent expression regulation. Each promoter has distinct transcription binding sites that are essential for the differential expression of its isoforms (Ke et al., 2016; Petz et al.,

2004; Schultz et al., 2003). The studied PR-B promoter region included only two of the *C/EBP* predicted sites and both of them are near a conserved CCAAT box, which could also be a putative *C/EBPβ* binding site such as that reported in MCF-7 breast cancer cells for the multidrug resistance gene MDR1 (Chen et al., 2004). Besides, in breast cancer cells, Sp1 has been reported to bind to PR-A promoter even in the absence of a hormonal stimulus (Petz et al., 2004), and here we show that it is also bound together with $ER\alpha$ to PR-B promoter. In a grade III human astrocytoma-derived cell line, a specific agonist for $ER\alpha$ increases PR isoforms content (González-Arenas et al., 2012), while in MCF-7 cells $ER\alpha$ enhances binding of Sp1 to both PR-B promoter binding sites without interacting with the DNA (Schultz et al., 2003), suggesting a strong protein-protein interaction between the two factors. Also, *C/EBPβ* and Sp1 have been found to be essential for the E2-induced expression of the human prolactin receptor gene (PrIR), where $ER\alpha$ tethers *C/EBPβ* to the Sp1-DNA complex to induce its expression. Moreover, $ER\alpha$ is

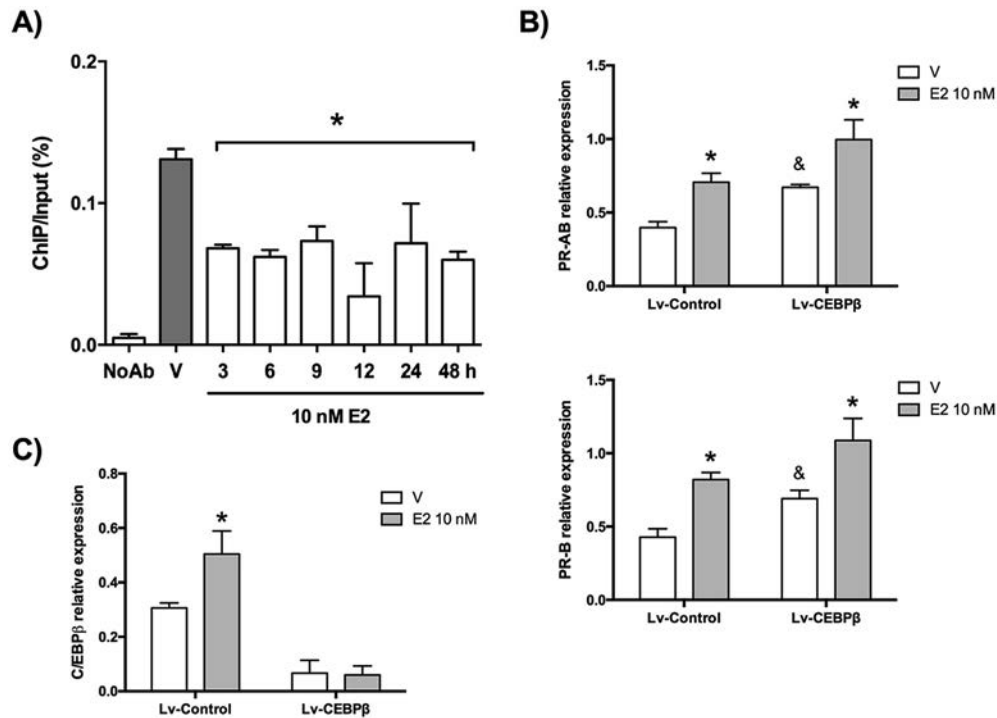


Fig. 5. E2 regulates C/EBP β binding to PR-B promoter and the expression of both PR and C/EBP β . The cells were grown in DMEM and 24 h before E2 treatment the medium was changed for phenol red DMEM supplemented with charcoal-stripped FBS. **A)** ChIP assays for C/EBP β were performed in U251 cells treated with 10 nM E2 for 3 h–48 h $^*P < 0.01$ vs. V, mean \pm S.E.M., $n = 3$. A negative control without antibody (NoAb) was included for comparison. **B)** Infected U251 cells were treated with E2 for 24 h and RT-qPCR for total PR and PR-B was performed. For total PR: $^*P < 0.01$ vs. V, mean \pm S.E.M., $n = 4$. For PR-AB and PR-B: $^*P < 0.01$ vs. V, mean \pm S.E.M., $n = 4$; $^{\&}P < 0.05$ vs. V Lv-Control, mean \pm S.E.M., $n = 4$. **C)** RT-qPCR for C/EBP β in infected U251 cells treated with E2 for 24 h $^*P < 0.01$ vs. V, mean \pm S.E.M., $n = 3$.

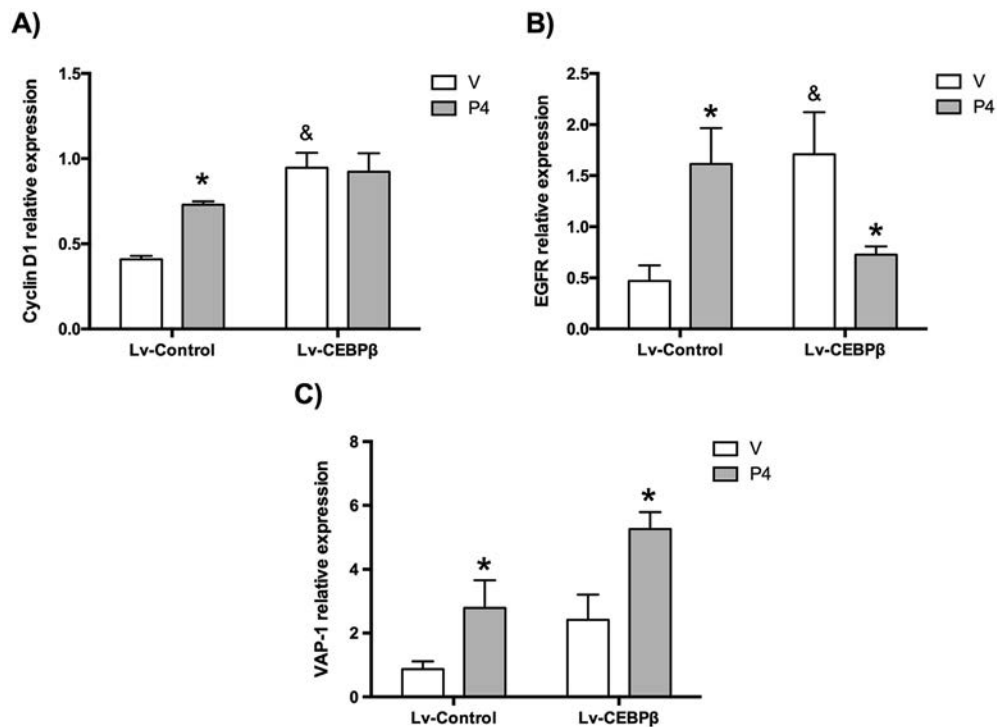


Fig. 6. P4 differentially regulates target genes in U251 cells with silenced C/EBP β . 24 h before treatments the cells infected with a control lentivirus (Lv) and a lentivirus carrying a shRNA against C/EBP β were cultured in phenol red medium supplemented with charcoal-stripped FBS and then were treated with P4 (10 nM) and vehicle (V, cyclodextrin 0.02%) for 6 h. RT-qPCR for known P4-induced genes such as cyclin D1 (**A**), EGFR (**B**) and VAP-1 (**C**) was performed. **A)** $^*P < 0.001$ vs. V, **B)** $^*P < 0.01$ vs. V and **C)** $^*P < 0.05$ vs. V for each condition, mean \pm S.E.M., $n = 3$. A statistical difference between vehicle treated cells of the two conditions was observed ($^{\&}P < 0.05$ vs. V Lv-Control, mean \pm S.E.M., $n = 3$).

constitutively bound to the PrLR gene promoter and E2 promotes the interaction of ER α with C/EBP β and Sp1 (Dong et al., 2006). Nevertheless, in U251 E2 treatment dissociates C/EBP β from PR-B promoter region, suggesting that the release of C/EBP β might be important for the E2-dependent expression of PR-B. Therefore the possible interplay between E2 signaling and C/EBP β in glioblastomas could be a relevant mechanism of PR expression regulation. Still, further studies such as mutational analysis and individual reconstitution of the C/EBP β isoforms are needed to understand the complex interplay between C/EBP β , Sp1, and ER α in PR-B expression regulation.

In other steroid hormone responding models, glucocorticoid stimulation promotes LIP dissociation from the repressive mSin3A/HDAC1 complex inducing an increase in gene transcription during adipocyte differentiation. In this model, the heterodimer LAP/LIP, where LAP is commonly associated with coactivators (p300), modulates gene transcription through the association with different coregulators and chromatin remodeling complexes (Abdou et al., 2013, 2011). In the cell line U251, the LAP/LIP ratio is particularly low suggesting that LIP is important for the negative regulation of PR-B in these cells. However, the transcriptional activity of C/EBP β depends also on post-translational modifications such as phosphorylation. C/EBP β is phosphorylated through several kinases pathways such as MAPK and PI3K/Akt, which prime for its subsequent phosphorylation by the glycogen synthase kinase 3 (GSK3- β) (Kim et al., 2007; Piwien-Pilipuk et al., 2001). This GSK3- β -dependent phosphorylation determines its transcriptional activity and degradation in a calpain-dependent manner (Zhang et al., 2012). Interestingly, in preadipocytes, growth hormone stimulation transiently inhibits GSK3- β and the subsequent dephosphorylation of C/EBP β promotes binding of LAP to the DNA but decreases that of LIP at the *c-fos* promoter. This LAP/LIP change at the promoter induces an increase in *c-fos* expression (Piwien-Pilipuk et al., 2001). In rat hippocampal neurons, E2 transiently activates GSK3- β after 1 h of treatment followed by a sustained inhibition until 6 h (Cardona-Gomez et al., 2004). This data opens new perspectives in studying the possible roles of E2 in the GSK3- β -dependent phosphorylation of C/EBP β and the changes in the LAP/LIP binding capabilities at the PR-B promoter in glioblastoma cells. Nevertheless, not only the C/EBP β isoforms expression ratio is important but the interaction with other regulatory proteins and the chromatin state in a particular cell context are fundamental factors that contribute to a specific cell fate.

Transcriptome analysis of the hippocampus of C/EBP β knockout mice showed an up-regulation of multiple target genes such as neuroxin 1, neuroplastin and synuclein alpha which are related to neuronal functions and implicated in several diseases (Kfoury and Kapatos, 2009). In this work, we propose that C/EBP β has an inhibiting role in PR-B expression regulation in U251 glioblastoma cells. In mice with germline deletions of C/EBP β , the mammary gland development is altered and the tissue is less responsive to hormone stimuli, although an increase in the expression of ER α , PR and PrLR was observed. In these mice, PR expression is increased in the mammary gland but not in the uterus, suggesting a cell context-specific regulation (Grimm et al., 2005, 2002; Seagroves et al., 2000). Interestingly, by using PR knockout mice, it has been reported that PR-B is fundamental for the mammary gland development, while PR-A is important for ovulation (Conneely and Lydon, 2000; Fernandez-Valdivia et al., 2005), suggesting that C/EBP β should participate in the differential regulation of PR in a tissue-specific manner. Remarkably, microarray studies in the breast cancer cell line T47D show that PR-B upregulates C/EBP β expression (Richer et al., 2002), indicating a complex regulation mechanism between both proteins. In glioblastomas, both transcription factors promote cell proliferation, and C/EBP β participates in the

epithelial-mesenchymal transition (Aguilar-Morante et al., 2011; Carro et al., 2010; González-Agüero et al., 2007), suggesting that they should be considered as possible therapeutic targets. In fact, PR antagonist mifepristone has been shown to cross the blood-brain barrier and in a case report it extended the lifetime and provide palliative effects to a glioblastoma patient (Check et al., 2014).

In glioblastomas, cyclin D1 is frequently deregulated while EGFR and VAP-1 are overexpressed (Cohen and Colman, 2015; Kostoro et al., 2016), and the three genes are known P4 targets (González-Arenas et al., 2014; Hernandez-Hernandez et al., 2012). C/EBP β knockdown increases baseline levels of EGFR and cyclin D1 independent of P4 treatment. In breast cancer cell lines, C/EBP β isoform LAP2 is known to activate cyclin D1 expression and LAP1 to repress it (Eaton et al., 2001) due to the SUMOylation of its N-terminal domain and its interaction with the chromatin remodeling complexes SNF2H and ACF1 (Steinberg et al., 2012). Also, LAP1 in conjunction with cyclin D1 promote mammary epithelial cell differentiation (Liu et al., 2014), suggesting an important role of C/EBP β and cyclin D1 in cell proliferation and differentiation. C/EBP β shorter isoform LIP inhibits EGFR expression in *kras* mutated colorectal cancer cells (Derer et al., 2012), which could account for the observed increase in EGFR expression after C/EBP β silencing. Besides, a negative correlation between PR and ER expression with that of EGFR has been established in breast cancer biopsies (Williams et al., 2015), and in a human endometrial cancer cell line, PR-B expression was associated with low EGFR expression levels (Ai et al., 2010). These data could explain the reduction in EGFR expression after treatment with P4 in Lv-CEBP β infected cells. Concerning VAP-1, until now there is no available data about the role of CEBP β in the regulation of this gene. Our results suggest that the regulation of cyclin D1 expression by PR in glioblastoma cells is C/EBP β dependent and that of EGFR and VAP-1 present multiple regulation mechanisms including that of PR.

In this work, we demonstrate that C/EBP β and PR isoforms are expressed in glioblastoma cells and that C/EBP β represses PR-B expression and participates in the ER-dependent regulation of the latter. Our work opens new perspectives in the regulatory mechanisms implicated in the differential PR isoform expression observed not only in glioblastomas but several types of cancer.

Author contribution

V.H.P and I.C.A. conceived the study and wrote the paper, V.H.P performed and analyzed the experiments, A.G.A provided technical assistance and contributed to the preparation of the figures. All authors reviewed the results and approved the final version of the manuscript.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

Acknowledgements

This work was financially supported by DGAPA-PAPIIT (IN201414), and PAIP (5000-9107), Facultad de Química, UNAM, México. We would like to thank Dr. Ángel Zarain Herzberg and Dr. Tzvetanka Dimitrova Dinkova, from Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, for their advice and suggestions to this work.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2016.09.018>

References

- Abdou, H.-S., Atlas, E., Haché, R.J.G., 2013. A positive regulatory domain in CCAAT/enhancer binding protein β (C/EBP β) is required for the glucocorticoid-mediated displacement of histone deacetylase 1 (HDAC1) from the C/ebp α promoter and maximum adipogenesis. *Endocrinology* 154, 1454–1464. <http://dx.doi.org/10.1210/en.2012-2061>.
- Abdou, H.-S., Atlas, E., Haché, R.J.G., 2011. Liver-enriched inhibitory protein (LIP) actively inhibits preadipocyte differentiation through histone deacetylase 1 (HDAC1). *J. Biol. Chem.* 286, 21488–21499. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M110.211540>.
- Aguilar-Morante, D., Cortes-Canteli, M., Sanz-Sancristobal, M., Santos, A., Perez-Castillo, A., 2011. Decreased CCAAT/enhancer binding protein β expression inhibits the growth of glioblastoma cells. *Neuroscience* 176, 110–119. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.12.025>.
- Ai, Z., Wang, J., Wang, Y., Lu, L., Tong, J., Teng, Y., 2010. Overexpressed epidermal growth factor receptor (EGFR)-induced progesterin insensitivity in human endometrial carcinoma cells by the EGFR/mitogen-activated protein kinase signaling pathway. *Cancer* 116, 3603–3613. <http://dx.doi.org/10.1002/cncr.25220>.
- Bégy, V., Smink, J.J., Loddenkemper, C., Zimmermann, K., Rudolph, C., Scheller, M., Steinemann, D., Leser, U., Schlegelberger, B., Stein, H., Leutz, A., 2015. Deregulation of the endogenous C/EBP β LIP isoform predisposes to tumorigenesis. *J. Mol. Med.* 93, 39–49. <http://dx.doi.org/10.1007/s00109-014-1215-5>.
- Blaustein, J.D., 2012. Steroid hormone receptors: long- and short-term integrators of the internal milieu and the external environment. *Horm. Metab. Res.* 44, 563–568. <http://dx.doi.org/10.1055/s-0032-1311605>.
- Bundy, L.M., Sealy, L., 2003. CCAAT/enhancer binding protein beta (C/EBP β)-2 transforms normal mammary epithelial cells and induces epithelial to mesenchymal transition in culture. *Oncogene* 22, 869–883. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.onc.1206216>.
- Cabrera-Muñoz, E., González-Arenas, A., Saqui-Salces, M., Camacho, J., Larrea, F., García-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. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsbmb.2008.11.009>.
- Calella, A.M., Nerlov, C., Lopez, R.G., Sciarretta, C., von Bohlen und Halbach, O., Bereshchenko, O., Minichiello, L., 2007. Neurotrophin/Trk receptor signaling mediates C/EBP α , - β and NeuroD recruitment to immediate-early gene promoters in neuronal cells and requires C/EBPs to induce immediate-early gene transcription. *Neural Dev.* 2, 1–21. <http://dx.doi.org/10.1186/1749-8104-2-4>.
- Calkhoven, C.F., Müller, C., Leutz, A., 2000. Translational control of C/EBP α and C/EBP β isoform expression. *Genes Dev.* 14, 1920–1932. <http://dx.doi.org/10.1101/gad.14.15.1920>.
- Cardona-Gomez, P., Perez, M., Avila, J., Garcia-Segura, L.M., Wandosell, F., 2004. Estradiol inhibits GSK3 and regulates interaction of estrogen receptors, GSK3, and beta-catenin in the hippocampus. *Mol. Cell. Neurosci.* 25, 363–373. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mcn.2003.10.008>.
- Carro, M.S., Lim, W.K., Alvarez, M.J., Bollo, R.J., Zhao, X., Snyder, E.Y., Sulman, E.P., Anne, S.L., Doetsch, F., Colman, H., Lasorella, A., Aldape, K., Califano, A., Iavarone, A., 2010. The transcriptional network for mesenchymal transformation of brain tumours. *Nature* 463, 318–325. <http://dx.doi.org/10.1038/nature08712>.
- Cartharius, K., Frech, K., Grote, K., Klocke, B., Haltmeier, M., Klingenhoff, A., Frisch, M., Bayerlein, M., Werner, T., 2005. MatInspector and beyond: promoter analysis based on transcription factor binding sites. *Bioinformatics* 21, 2933–2942. <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/bti473>.
- Check, J.H., Wilson, C., Cohen, R., Sarumi, M., 2014. Evidence that mifepristone, a progesterone receptor antagonist, can cross the blood brain barrier and provide palliative benefits for glioblastoma multiforme grade IV. *Anticancer Res.* 34, 2385–2388. <http://dx.doi.org/10.1158/1538-7445.AM2013-485>.
- Chen, G.K., Sale, S., Tan, T., Ermoian, R.P., Sikic, B.I., 2004. CCAAT/enhancer-binding protein beta (nuclear factor for interleukin 6) transactivates the human MDR1 gene by interaction with an inverted CCAAT box in human cancer cells. *Mol. Pharmacol.* 65, 906–916. <http://dx.doi.org/10.1124/mol.65.4.906>.
- Christian, M., Pohnke, Y., Kempf, R., Gellersen, B., Brosens, J.J., 2002. Functional association of PR and CCAAT/enhancer-binding protein beta isoforms: promoter-dependent cooperation between PR-B and liver-enriched inhibitory protein, or liver-enriched activatory protein and PR-A in human endometrial stromal cells. *Mol. Endocrinol.* 16, 141–154. <http://dx.doi.org/10.1210/mend.16.1.0763>.
- Clementi, C., Tripurani, S.K., Large, M.J., Edson, M.A., Creighton, C.J., Hawkins, S.M., Kovanci, E., Kaartinen, V., Lydon, J.P., Pangas, S.A., DeMayo, F.J., Matzuk, M.M., 2013. Activin-like kinase 2 functions in peri-implantation uterine signaling in mice and humans. *PLoS Genet.* 9, e1003863. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.1003863>.
- Cohen, A.L., Colman, H., 2015. Glioma biology and molecular markers. *Cancer Treat. Res.* 163, 15–30. http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-12048-5_2.
- Conneely, O.M., Lydon, J.P., 2000. Progesterone receptors in reproduction: functional action of the A and B isoforms. *Steroids* 65, 571–577. [http://dx.doi.org/10.1016/S0039-128X\(00\)00115-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0039-128X(00)00115-X).
- Cortes-Canteli, M., Aguilar-Morante, D., Sanz-Sancristobal, M., Megias, D., Santos, A., Perez-Castillo, A., 2011. Role of C/EBP β transcription factor in adult hippocampal neurogenesis. *PLoS One* 6, e24842. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0024842>.
- Derer, S., Berger, S., Schlaeth, M., Schneider-Merck, T., Klausz, K., Lohse, S., Overdijk, M.B., Dechant, M., Kellner, C., Nagelmeier, I., Scheel, A.H., Lammerts van Bueren, J.J., van de Winkel, J.G.J., Parren, P.W.H.I., Peipp, M., Valerius, T., 2012. Oncogenic KRAS impairs EGFR antibodies' efficiency by C/EBP β -dependent suppression of EGFR expression. *Neoplasia* 14, 190–205. <http://dx.doi.org/10.1593/neo.111636>.
- Diep, C.H., Daniel, A.R., Mauro, L.J., Knutson, T.P., Lange, C.A., 2015. Progesterone action in breast, uterine, and ovarian cancers. *J. Mol. Endocrinol.* 54, R31–R53. <http://dx.doi.org/10.1530/JME-14-0252>.
- Dong, J., Tsai-Morris, C.-H., Dufau, M.L., 2006. A novel estradiol/estrogen receptor alpha-dependent transcriptional mechanism controls expression of the human prolactin receptor. *J. Biol. Chem.* 281, 18825–18836. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M512826200>.
- Eaton, E.M., Hanlon, M., Bundy, L., Sealy, L., 2001. Characterization of C/EBP β isoforms in normal versus neoplastic mammary epithelial cells. *J. Cell. Physiol.* 189, 91–105. <http://dx.doi.org/10.1002/jcp.1139>.
- Fernandez-Valdivia, R., Mukherjee, A., Mulac-Jricevic, B., Conneely, O.M., DeMayo, F.J., Amato, P., Lydon, J.P., 2005. Revealing progesterone's role in uterine and mammary gland biology: insights from the mouse. *Semin. Reprod. Med.* 23, 22–37. <http://dx.doi.org/10.1055/s-2005-864031>.
- Foy, M.R., Baudry, M., Akopian, G.K., Thompson, R.F., 2010. Regulation of hippocampal synaptic plasticity by estrogen and progesterone. *Vitam. Horm.* 82, 219–239. [http://dx.doi.org/10.1016/S0083-6729\(10\)82012-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0083-6729(10)82012-6).
- Germán-Castellán, L., Manjarrez-Marmolejo, J., González-Arenas, A., González-Morán, M.G., Camacho-Arroyo, I., 2014. Progesterone induces the growth and infiltration of human astrocytoma cells implanted in the cerebral cortex of the rat. *Biomed. Res. Int.* 2014, 1–8. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/393174>.
- González-Aguero, G., Gutiérrez, A.A., González-Espinosa, D., Solano, J.D., Morales, R., González-Arenas, A., Cabrera-Muñoz, E., Camacho-Arroyo, I., 2007. Progesterone effects on cell growth of U373 and D54 human astrocytoma cell lines. *Endocrine* 32, 129–135. <http://dx.doi.org/10.1007/s12020-007-9023-0>.
- González-Aguero, G., Ondarza, R., Gamboa-Domínguez, A., Cerbón, M.A., Camacho-Arroyo, I., 2001. Progesterone receptor isoforms expression pattern in human astrocytomas. *Brain Res. Bull.* 56, 43–48. [http://dx.doi.org/10.1016/S0361-9230\(01\)00590-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0361-9230(01)00590-1).
- González-Arenas, A., Cabrera-Wrooman, A., Díaz, N., González-García, T., Salido-Guadarrama, I., Rodríguez-Dorantes, M., Camacho-Arroyo, I., 2014. Progesterone receptor subcellular localization and gene expression profile in human astrocytoma cells are modified by progesterone. *Nucl. Recept. Res.* 1, 1–10. <http://dx.doi.org/10.1131/2014/101098>.
- González-Arenas, A., Hansberg-Pastor, V., Hernández-Hernández, O.T., González-García, T.K., Henderson-Villalpando, J., Lemus-Hernández, D., Cruz-Barrios, A., Rivas-Suárez, M., Camacho-Arroyo, I., 2012. Estradiol increases cell growth in human astrocytoma cell lines through ER α activation and its interaction with SRC-1 and SRC-3 coactivators. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* 1823, 379–386. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2011.11.004>.
- González-Arenas, A., Peña-Ortiz, M.A., Hansberg-Pastor, V., Marquina-Sánchez, B., Baranda-Ávila, N., Nava-Castro, K., Cabrera-Wrooman, A., González-Jorge, J., Camacho-Arroyo, I., 2015. PKC α and PKC δ activation regulates transcriptional activity and degradation of progesterone receptor in human astrocytoma cells. *Endocrinology* 156, 1010–1022. <http://dx.doi.org/10.1210/en.2014-1137>.
- Grimm, S.L., Contreras, A., Barcellos-Hoff, M.-H., Rosen, J.M., 2005. Cell cycle defects contribute to a block in hormone-induced mammary gland proliferation in CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP β)-null mice. *J. Biol. Chem.* 280, 36301–36309. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M508167200>.
- Grimm, S.L., Seagroves, T.N., Kabotyanski, E.B., Hovey, R.C., Vonderhaar, B.K., Lydon, J.P., Miyoshi, K., Hennighausen, L., Ormandy, C.J., Lee, A.V., Stull, M.A., Wood, T.L., Rosen, J.M., 2002. Disruption of steroid and prolactin receptor patterning in the mammary gland correlates with a block in lobuloalveolar development. *Mol. Endocrinol.* 16, 2675–2691. <http://dx.doi.org/10.1210/me.2002-0239>.
- Hansberg-Pastor, V., González-Arenas, A., Peña-Ortiz, M.A., García-Gómez, E., Rodríguez-Dorantes, M., Camacho-Arroyo, I., 2013. The role of DNA methylation and histone acetylation in the regulation of progesterone receptor isoforms expression in human astrocytoma cell lines. *Steroids* 78, 500–507. <http://dx.doi.org/10.1016/j.steroids.2013.02.010>.
- Hansberg-Pastor, V., Piña-Medina, A.G., González-Arenas, A., Camacho-Arroyo, I., 2015. C/EBP β isoforms expression in the rat brain during the estrous cycle. *Int. J. Endocrinol.* 2015, 1–7. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/674915>.
- Hernandez-Hernandez, O.T., Gonzalez-Garcia, T.K., Camacho-Arroyo, I., 2012. Progesterone receptor and SRC-1 participate in the regulation of VEGF, EGFR and Cyclin D1 expression in human astrocytoma cell lines. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 132, 127–134. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsbmb.2012.04.005>.
- Homma, J., Yamanaka, R., Yajima, N., Tsuchiya, N., Genkai, N., Sano, M., Tanaka, R., 2006. Increased expression of CCAAT/enhancer binding protein beta correlates with prognosis in glioma patients. *Oncol. Rep.* 15, 595–601. <http://dx.doi.org/10.3892/or.15.3.595>.
- Inoue, T., Akahira, J.-I., Suzuki, T., Darnel, A.D., Kaneko, C., Takahashi, K., Hatori, M.,

- Shirane, R., Kumabe, T., Kurokawa, Y., Satomi, S., Sasano, H., 2002. Progesterone production and actions in the human central nervous system and neurogenic tumors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87, 5325–5331. <http://dx.doi.org/10.1210/jc.2002-012096>.
- Jacobsen, B.M., Schittone, S.A., Richer, J.K., Horwitz, K.B., 2005. Progesterone-independent effects of human progesterone receptors (PRs) in estrogen receptor-positive breast cancer: PR isoform-specific gene regulation and tumor biology. *Mol. Endocrinol.* 19, 574–587. <http://dx.doi.org/10.1210/me.2004-0287>.
- 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.
- Ke, W., Chen, C., Luo, H., Tang, J., Zhang, Y., Gao, W., Yang, X., Tian, Z., Chang, Q., Liang, Z., 2016. Histone Deacetylase 1 regulates the expression of progesterone receptor A during human parturition by occupying the progesterone receptor A promoter. *Reprod. Sci.* 23, 955–964. <http://dx.doi.org/10.1177/1933719115625848>.
- Kfoury, N., Kapatou, G., 2009. Identification of neuronal target genes for CCAAT/enhancer binding proteins. *Mol. Cell. Neurosci.* 40, 313–327. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mcn.2008.11.004>.
- 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. [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0142\(19971201\)80:11<2133::AID-CNCR13>3.0.CO;2#](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1097-0142(19971201)80:11<2133::AID-CNCR13>3.0.CO;2#).
- Kim, J.-W., Tang, Q.-Q., Li, X., Lane, M.D., 2007. Effect of phosphorylation and S-S bond-induced dimerization on DNA binding and transcriptional activation by C/EBPbeta. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 1800–1804. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0611137104>.
- Kostoro, J., Chang, S.-J., Clark Lai, Y.-C., Wu, C.-C., Chai, C.-Y., Kwan, A.-L., 2016. Overexpression of vascular adhesion protein-1 is associated with poor prognosis of astrocytomas. *APMIS* 124, 462–468. <http://dx.doi.org/10.1111/apm.12525>.
- Kreizman-Shefer, H., Pricop, J., Goldman, S., Elmalah, I., Shalev, E., 2014. Distribution of estrogen and progesterone receptors isoforms in endometrial cancer. *Diagn. Pathol.* 9, 1–8. <http://dx.doi.org/10.1186/1746-1596-9-77>.
- Landschulz, W.H., Johnson, P.F., McKnight, S.L., 1989. The DNA binding domain of the rat liver nuclear protein C/EBP is bipartite. *Science* 243, 1681–1688. <http://dx.doi.org/10.1126/science.2494700>.
- Lange, C.A., Shen, T., Horwitz, K.B., 2000. Phosphorylation of human progesterone receptors at serine-294 by mitogen-activated protein kinase signals their degradation by the 26S proteasome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 1032–1037.
- Liu, Q., Boudot, A., Ni, J., Hennessey, T., Beauparlant, S.L., Rajabi, H.N., Zahnov, C., Ewen, M.E., 2014. Cyclin D1 and C/EBPβ LAP1 operate in a common pathway to promote mammary epithelial cell differentiation. *Mol. Cell. Biol.* 34, 3168–3179. <http://dx.doi.org/10.1128/MCB.00039-14>.
- Mantena, S.R., Kannan, A., Cheon, Y.-P., Li, Q., Johnson, P.F., Bagchi, I.C., Bagchi, M.K., 2006. C/EBPbeta is a critical mediator of steroid hormone-regulated cell proliferation and differentiation in the uterine epithelium and stroma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 1870–1875. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0507261103>.
- Mathelier, A., Zhao, X., Zhang, A.W., Parcy, F., Worsley-Hunt, R., Arenillas, D.J., Buchman, S., Chen, C., Chou, A., Ienasescu, H., Lim, J., Shyr, C., Tan, G., Zhou, M., Lenhard, B., Sandelin, A., Wasserman, W.W., 2014. JASPAR 2014: an extensively expanded and updated open-access database of transcription factor binding profiles. *Nucleic Acids Res.* 42, D142–D147. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkt997>.
- McEwen, B.S., 2014. Sex, stress and the brain: interactive actions of hormones on the developing and adult brain. *Climacteric* 17, 18–25. <http://dx.doi.org/10.3109/13697137.2014.949662>.
- Murase, R., Sumida, T., Kawamura, R., Onishi-Ishikawa, A., Hamakawa, H., McAllister, S.D., Desprez, P.-Y., 2016. Suppression of invasion and metastasis in aggressive salivary cancer cells through targeted inhibition of ID1 gene expression. *Cancer Lett.* 377, 11–16. <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2016.04.021>.
- Osada, S., Yamamoto, H., Nishihara, T., Imagawa, M., 1996. DNA binding specificity of the CCAAT/enhancer-binding protein transcription factor family. *J. Biol. Chem.* 271, 3891–3896. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.271.7.3891>.
- Patel, B., Elguero, S., Thakore, S., Dahoud, W., Bedaiwy, M., Mesiano, S., 2015. Role of nuclear progesterone receptor isoforms in uterine pathophysiology. *Hum. Reprod. Update* 21, 155–173. <http://dx.doi.org/10.1093/humupd/dmu056>.
- Peña-Altamira, E., Polazzi, E., Moretto, E., Lauriola, M., Monti, B., 2014. The transcription factor CCAAT enhancer-binding protein β protects rat cerebellar granule neurons from apoptosis through its transcription-activating isoforms. *Eur. J. Neurosci.* 39, 176–185. <http://dx.doi.org/10.1111/ejn.12407>.
- Petz, L.N., Nardulli, A.M., 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, 972–985. <http://dx.doi.org/10.1210/mend.14.7.0493>.
- Petz, L.N., Ziegler, Y.S., Schultz, J.R., Kim, H., Kemper, J.K., Nardulli, A.M., 2004. Differential regulation of the human progesterone receptor gene through an estrogen response element half site and Sp1 sites. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 88, 113–122. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsmb.2003.11.008>.
- Piña-Medina, A.G., Hansberg-Pastor, V., González-Arenas, A., Cerbón, M., Camacho-Arroyo, I., 2016. Progesterone promotes cell migration, invasion and cofilin activation in human astrocytoma cells. *Steroids* 105, 19–25. <http://dx.doi.org/10.1016/j.steroids.2015.11.008>.
- Piwien-Pilipuk, G., Van Mater, D., Ross, S.E., MacDougald, O.A., Schwartz, J., 2001. Growth hormone regulates phosphorylation and function of CCAAT/enhancer-binding protein beta by modulating Akt and glycogen synthase kinase-3. *J. Biol. Chem.* 276, 19664–19671. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M010193200>.
- Pulido-Salgado, M., Vidal-Taboada, J.M., Saura, J., 2015. C/EBPβ and C/EBPδ transcription factors: basic biology and roles in the CNS. *Prog. Neurobiol.* 132, 1–33. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pneurobio.2015.06.003>.
- Ramji, D.P., Foka, P., 2002. CCAAT/enhancer-binding proteins: structure, function and regulation. *Biochem. J.* 365, 561–575. <http://dx.doi.org/10.1042/BJ20020508>.
- Richer, J.K., Jacobsen, B.M., Manning, N.G., Abel, M.G., Wolf, D.M., Horwitz, K.B., 2002. Differential gene regulation by the two progesterone receptor isoforms in human breast cancer cells. *J. Biol. Chem.* 277, 5209–5218. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M110090200>.
- Safe, S., Kim, K., 2008. Non-classical genomic estrogen receptor (ER)/specificity protein and ER/activating protein-1 signaling pathways. *J. Mol. Endocrinol.* 41, 263–275. <http://dx.doi.org/10.1677/JME-08-0103>.
- Saint-Auret, G., Danan, J.-L., Hiron, M., Blache, C., Sulpice, E., Tendil, S., Daveau, M., Gidrol, X., Salier, J.-P., 2011. Characterization of the transcriptional signature of C/EBPbeta isoforms (LAP/LIP) in Hep3B cells: implication of LIP in pro-survival functions. *J. Hepatol.* 54, 1185–1194. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2010.09.021>.
- Savic, D., Roberts, B.S., Carleton, J.B., Partridge, E.C., White, M.A., Cohen, B.A., Cooper, G.M., Gertz, J., Myers, R.M., 2015. Promoter-distal RNA polymerase II binding discriminates active from inactive CCAAT/enhancer-binding protein beta binding sites. *Genome Res.* 25, 1791–1800. <http://dx.doi.org/10.1101/gr.191593.115>.
- Schultz, J.R., Petz, L.N., Nardulli, A.M., 2003. Estrogen receptor alpha and Sp1 regulate progesterone receptor gene expression. *Mol. Cell. Endocrinol.* 201, 165–175. [http://dx.doi.org/10.1016/S0303-7207\(02\)00415-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0303-7207(02)00415-X).
- Schwartz, C., Catez, P., Rohr, O., Lecestre, D., Aunis, D., Schaeffer, E., 2000. Functional interactions between C/EBP, Sp1, and COUP-TF regulate human immunodeficiency virus type 1 gene transcription in human brain cells. *J. Virol.* 74, 65–73. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.74.1.65-73.2000>.
- Schwartzbaum, J.A., Fisher, J.L., Aldape, K.D., Wrensch, M., 2006. Epidemiology and molecular pathology of glioma. *Nat. Clin. Pract. Neurol.* 2, 494–503. <http://dx.doi.org/10.1038/ncpneuro0289>.
- Scott, R.E.M., Wu-Peng, X.S., Pfaff, D.W., 2002. Regulation and expression of progesterone receptor mRNA isoforms A and B in the male and female rat hypothalamus and pituitary following oestrogen treatment. *J. Neuroendocrinol.* 14, 175–183. <http://dx.doi.org/10.1046/j.0007-1331.2001.00750.x>.
- Seagroves, T.N., Lydon, J.P., Hovey, R.C., Vonderhaar, B.K., Rosen, J.M., 2000. C/EBP-beta (CCAAT/enhancer binding protein) controls cell fate determination during mammary gland development. *Mol. Endocrinol.* 14, 359–368. <http://dx.doi.org/10.1210/mend.14.3.0434>.
- Steinberg, X.P., Hepp, M.I., Fernández García, Y., Suganuma, T., Swanson, S.K., Washburn, M., Workman, J.L., Gutiérrez, J.L., 2012. Human CCAAT/enhancer-binding protein β interacts with chromatin remodeling complexes of the imitation switch subfamily. *Biochemistry* 51, 952–962. <http://dx.doi.org/10.1021/bi201593q>.
- Sterneck, E., Johnson, P.F., 1998. CCAAT/enhancer binding protein beta is a neuronal transcriptional regulator activated by nerve growth factor receptor signaling. *J. Neurochem.* 70, 2424–2433. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1471-4159.1998.70062424.x>.
- Strohmeier, R., Shelton, J., Lougheed, C., Breitkopf, T., 2014. CCAAT-enhancer binding protein-β expression and elevation in Alzheimer's disease and microglial cell cultures. *PLoS One* 9, e86617. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0086617>.
- Tsukada, J., Yoshida, Y., Kominato, Y., Auron, P.E., 2011. The CCAAT/enhancer (C/EBP) family of basic-leucine zipper (bZIP) transcription factors is a multifaceted highly-regulated system for gene regulation. *Cytokine* 54, 6–19. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cyto.2010.12.019>.
- Wagner, C.K., Pfau, J.L., De Vries, G.J., Merchenthaler, I.J., 2001. Sex differences in progesterone receptor immunoreactivity in neonatal mouse brain depend on estrogen receptor alpha expression. *J. Neurobiol.* 47, 176–182. <http://dx.doi.org/10.1002/neu.1025>.
- Wargon, V., Riggio, M., Giulianelli, S., Sequeira, G.R., Rojas, P., May, M., Polo, M.L., Gorostiga, M.A., Jacobsen, B., Molinolo, A., Novaro, V., Lanari, C., 2015. Progesterin and antiprogesterin responsiveness in breast cancer is driven by the PRA/PRB ratio via AIB1 or SMRT recruitment to the CCND1 and MYC promoters. *Int. J. Cancer* 136, 2680–2692. <http://dx.doi.org/10.1002/ijc.29304>.
- Williams, C.B., Soloff, A.C., Ethier, S.P., Yeh, E.S., 2015. Perspectives on epidermal growth factor receptor regulation in triple-negative breast cancer: ligand-mediated mechanisms of receptor regulation and potential for clinical targeting. *Adv. Cancer Res.* 127, 253–281. <http://dx.doi.org/10.1016/bs.acr.2015.04.008>.
- Yu, Y., Liu, L., Xie, N., Xue, H., Fazli, L., Buttyan, R., Wang, Y., Gleave, M., Dong, X., 2013. Expression and function of the progesterone receptor in human prostate stroma provide novel insights to cell proliferation control. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 98, 2887–2896. <http://dx.doi.org/10.1210/jc.2012-4000>.
- Zahnov, C.A., 2009. CCAAT/enhancer-binding protein beta: its role in breast cancer and associations with receptor tyrosine kinases. *Expert Rev. Mol. Med.* 11, 1–34. <http://dx.doi.org/10.1017/S1462399409001033>.
- Zhang, Y., Li, S., Qian, S., Zhang, Y., Liu, Y., Tang, Q.-Q., Li, X., 2012. Phosphorylation prevents C/EBPβ from the calpain-dependent degradation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 419, 550–555. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.02.058>.

Research Article

C/EBP β Isoforms Expression in the Rat Brain during the Estrous Cycle

Valeria Hansberg-Pastor,¹ Ana Gabriela Piña-Medina,²
Aliesha González-Arenas,³ and Ignacio Camacho-Arroyo²

¹Departamento de Biología, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, DF, Mexico

²Unidad de Investigación en Reproducción Humana, Instituto Nacional de Perinatología-Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Avenida Universidad 3000, Coyoacán, 04510 Ciudad de México, DF, Mexico

³Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, DF, Mexico

Correspondence should be addressed to Ignacio Camacho-Arroyo; camachoarroyo@gmail.com

Received 15 December 2014; Revised 2 April 2015; Accepted 2 April 2015

Academic Editor: Henrik Falhammar

Copyright © 2015 Valeria Hansberg-Pastor et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

The CCAAT/enhancer-binding protein beta (C/EBP β) is a transcription factor expressed in different areas of the brain that regulates the expression of several genes involved in cell differentiation and proliferation. This protein has three isoforms (LAP1, LAP2, and LIP) with different transcription activation potential. The role of female sex hormones in the expression pattern of C/EBP β isoforms in the rat brain has not yet been described. In this study we demonstrate by western blot that the expression of the three C/EBP β isoforms changes in different brain areas during the estrous cycle. In the cerebellum, LAP2 content diminished on diestrus and proestrus and LIP content diminished on proestrus and estrus days. In the prefrontal cortex, LIP content was higher on proestrus and estrus days. In the hippocampus, LAP isoforms presented a switch on diestrus day, since LAP1 content was the highest while that of LAP2 was the lowest. The LAP2 isoform was the most abundant one in all the three brain areas. The LAP/LIP ratio changed throughout the cycle and was tissue specific. These results suggest that C/EBP β isoforms expression changes in a tissue-specific manner in the rat brain due to the changes in sex steroid hormone levels presented during the estrous cycle.

1. Introduction

The CCAAT/enhancer-binding proteins (C/EBP) is a family of transcription factors that consist of six members (C/EBP α -C/EBP ζ) named according to their chronological order of discovery. These proteins are solely eukaryotic and bind as dimers to specific DNA sequences to regulate gene transcription. They have a highly conserved C-terminal bZIP domain comprising a leucine-zipper dimerization domain and a basic DNA binding region. Particularly, the isotype C/EBP β is involved in different functions such as cell proliferation and differentiation, cell survival, apoptosis, metabolism, and immune response [1, 2].

The expression of C/EBP β is regulated by a number of factors like hormones, nutrients, cytokines, mitogens, and

several transcription factors (CREB, NF κ B, Sp1, and STAT-3) [2, 3]. C/EBP β has three isoforms that are translated from a single transcript by the alternative use of different AUG initiation codons within the same open reading frame [4, 5]. C/EBP β isoforms were first identified in the liver and therefore known as LAP1 and LAP2 (for liver activating proteins) and LIP (for liver inhibitory protein). LAP2 (34 kDa) is suggested to be a stronger transactivator than the full-length isoform LAP1 (38 kDa). The shorter isoform LIP (20 kDa) lacks the N-terminal transactivation domains and frequently acts as a dominant negative [1, 6]. However, the transactivation potential of these isoforms depends on the LAP/LIP ratio, which is important to modulate cell fate.

C/EBP β has been associated with key functions in the central nervous system (CNS) such as learning, memory,

and cognition [2]. It is widely expressed in several brain regions, both in neurons and astrocytes [7, 8]. In the neonatal male rat brain, C/EBP β is found in the cerebellum, cerebral cortex, hippocampus, thalamus, and brainstem. In mice neuroblastoma N2A cells, C/EBP β participates in neurite extension and cell differentiation through the activation of PI3K signaling [9]. In the dentate gyrus of the hippocampus, C/EBP β is important for the proliferation of newborn cells. Mice lacking this protein have reduced newborn cell survival, decreased neuronal differentiation, and fewer cells proliferating in the subgranular zone of the dentate gyrus [10]. Also, C/EBP β has been associated with protection of cerebellar granular neuron death [11] or as part of the neuronal injury response to activate regeneration-associated genes [12]. Despite the important role of C/EBP β in the CNS and the different transcriptional activity of its isoforms, most studies report its expression without considering the three isoforms, usually reporting only the abundant LAP2 isoform.

Sex steroid hormones regulate a number of different processes affecting not only reproductive traits but also the CNS. Estradiol (E2) and progesterone (P4) participate in memory consolidation, cognitive functions, brain plasticity, neuronal damage protection, and brain tumors growth [13–16]. These hormones regulate these functions by modulating the expression of target genes through the interaction with its intracellular receptors [17–19]. The regulation of C/EBP β expression by hormones has been studied in other sex hormone target organs such as endometrium and mammary gland. C/EBP β is an essential factor during embryo implantation and decidualization in mice and primates [20–22]. Studies with knockout mice for C/EBP β show that the animals are infertile due to failure in ovulation and luteinization [23]. C/EBP β is also important for E2-induced proliferation of uterine epithelial cells in nonpregnant mice [20] and for the normal development and function of the mammary gland [24]. LIP isoform expression increases in the mammary gland during rat pregnancy and after parturition [25]. There is evidence that changes in C/EBP β isoform ratio (LAP/LIP) are important for the cellular response to ovarian P4 in the reproductive tract [26]. C/EBP β can also interact with estrogen receptor (ER) to induce the expression of genes involved in milk production in the mammary gland [27]. Some recent evidence shows that C/EBP β binds to progesterone receptor (PR) intron 2 in human uterine stromal cells, probably modulating its expression [28].

Notwithstanding the effects of sex hormones and C/EBP β in different reproductive organs and the CNS, there are no studies regarding the effects of sex hormones in C/EBP β expression in the brain. In this study we demonstrated that the expression of the three C/EBP β isoforms in different brain areas depends on sex hormone level variations presented throughout the estrous cycle.

2. Materials and Methods

2.1. Animals. 24 intact Sprague Dawley female rats (90 days of age, 250 g) certified by Harlan Laboratories, Inc. (Harlan, Mexico City, MEX) were maintained under a 12 h light-dark cycle (lights on from 6:00 am to 6:00 pm) with food and

water available *ad libitum*. Rats, which presented at least three regular 4-day estrous cycles, were used as determined by daily vaginal smears. Rats were killed by decapitation in the morning (10:00 am) of metestrus, diestrus, proestrus, and estrus. The brains were dissected into three regions according to the Atlas of Paxinos and Watson [29]: prefrontal cortex, hippocampus, and cerebellum. All samples were immediately processed for protein extraction. The experiments were performed according to the Official Mexican Norm (NOM-062-ZOO-1999) in strict accordance with the recommendations of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the National Institutes of Health of the USA.

2.2. Estrous Cycle Evaluation. Daily, vaginal smears were stained to determine the cycle phases of the rats. The slides with the smears were first stained with a ready-to-use hematoxylin (Biocare Medical, CA, USA) for 10 min and gently washed with tap water. Slides were dipped in a saturated lithium carbonate solution for 3 min to intensify the staining, washed with water to remove the salt, and air dried at room temperature (RT). Then, the slides were covered with alcoholic eosin (Biocare Medical, CA, USA) for 10 min, washed with 70% ethanol, and air dried at RT. The vaginal smears were observed under an optical microscope Olympus BX41 (Olympus, PA, USA).

2.3. Western Blot. Samples were homogenized in RIPA lysis buffer with protease inhibitors (1 mM EDTA, 2 μ g/mL leupeptin, 2 μ g/mL aprotinin, 1 mM PMSF) and proteins were obtained by centrifugation at 12500 rpm, at 4°C for 15 min and quantified using a NanoDrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, MA, USA). 70 μ g of total protein was separated by electrophoresis on a 12% SDS-PAGE at 20 mA; colored markers (Bio-Rad, CA, USA) were included for size determination. Gels were transferred to nitrocellulose membranes (Millipore, MA, USA) (35 mA) in semidry conditions at RT for 1 h. Membranes were blocked with 3% nonfat dry milk and 1% bovine serum albumin at RT for 2 h and then incubated with an antibody against the three C/EBP β isoforms (0.6 μ g/mL) (ab32358, Abcam, Cambridge, ENG) at 4°C for 48 h. Afterwards, blots were incubated with anti-rabbit secondary antibody (1:7500) conjugated to horseradish peroxidase (Santa Cruz Biotechnology, TX, USA) at RT for 45 min. In order to correct for differences in the amount of total protein loaded in each lane, C/EBP β isoforms content was normalized to that of α -tubulin. Blots were stripped with glycine (0.1 M, pH 2.5, 0.5% SDS) at RT for 30 min and incubated with 0.2 μ g/mL of mouse anti- α -tubulin monoclonal antibody (sc-5286, Santa Cruz Biotechnology, TX, USA) at 4°C overnight. Blots were incubated with a 1:3000 dilution of goat anti-mouse IgG conjugated to horseradish peroxidase (Santa Cruz Biotechnology, TX, USA) at RT for 45 min. Chemiluminescence signals were detected exposing membranes to Kodak Biomax Light Film (Sigma-Aldrich, MO, USA) using Supersignal West Femto as peroxidase substrate (Thermo Scientific, MA, USA) with a constant exposure time of 5 min for C/EBP β and 30 seconds for α -tubulin. The antigen-antibody complex was detected as the area under a peak corresponding to a band density (the

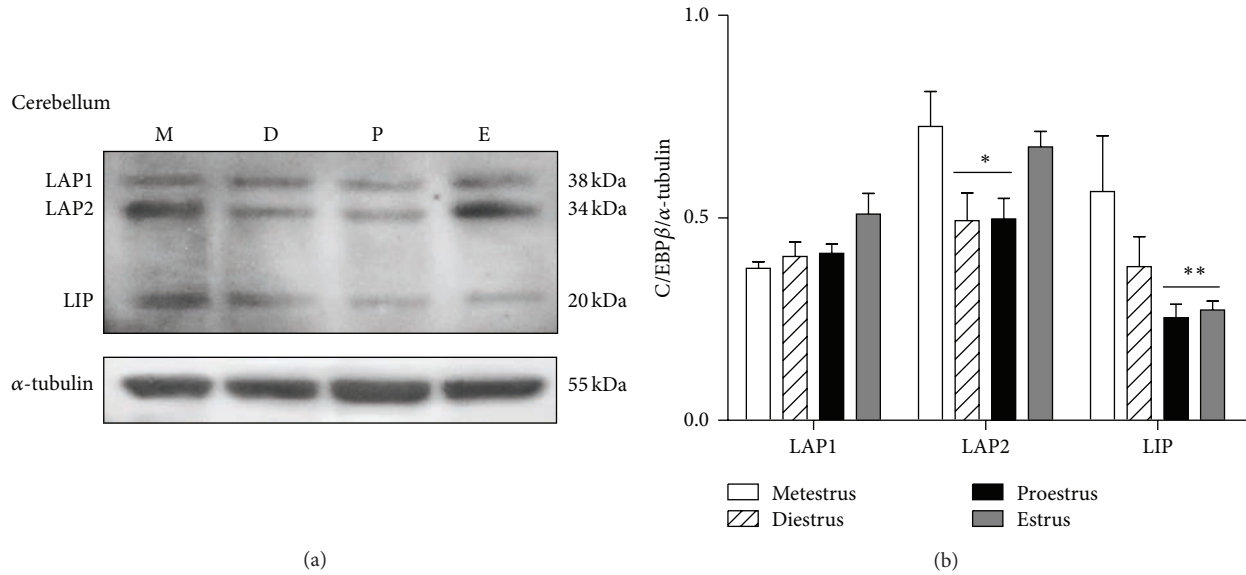


FIGURE 1: C/EBP β isoforms LAP1, LAP2, and LIP content in the rat cerebellum throughout the estrous cycle. (a) A representative western blot for the three C/EBP β isoforms during metestrus (M), diestrus (D), proestrus (P), and estrus (E). (b) Densitometric analysis of C/EBP β isoforms with respect to α -tubulin content. The data represent the mean \pm S.E.M, $n = 6$, * $P < 0.05$ LAP2 diestrus and proestrus versus metestrus and estrus; ** $P < 0.05$ LIP proestrus and estrus versus metestrus and diestrus.

area is given in inches with a default scale of 72 pixels/inch) in a semiquantitative way using a 14.1 megapixels digital Canon camera (SD1400IS, Canon, Mexico City, MEX) and the ImageJ 1.45S software (National Institutes of Health, USA). In order to minimize interassay variations, all western blots were carried out in parallel for each brain region.

2.4. Statistical Analysis. All data were analyzed and plotted using the GraphPad Prism 5.0 software for Windows 8.1 (GraphPad Software, CA, USA). A statistical analysis between comparable groups was performed using a two-way ANOVA with a Bonferroni posttest. The LAP/LIP ratio for each brain region was analyzed using a Kruskal-Wallis test followed by a Dunn posttest. A value of $P < 0.05$ was considered statistically significant as stated in the figure legends.

3. Results

The three isoforms of C/EBP β , LAP1 (38 kDa), LAP2 (34 kDa), and LIP (20 kDa) were clearly identified by western blot in the cerebellum, prefrontal cortex, and hippocampus of the rat. In all the studied brain areas the 34 kDa LAP2 isoform was the more abundant one.

In the cerebellum, the content of LAP1 showed a non-significant increase on estrus day. LAP2 content diminished on diestrus and proestrus days, while LIP showed a reduced content during proestrus and estrus (Figure 1). In the prefrontal cortex, LIP was the unique isoform that presented changes throughout the estrous cycle. This isoform increased its content during proestrus and estrus (Figure 2). In the hippocampus, the larger isoforms LAP1 and LAP2

TABLE 1: The LAP/LIP ratio in the different brain areas throughout the estrous cycle. The ratio was expressed as the average of both LAP1 and LAP2 isoforms content to that of the LIP isoform. The data represent the ratios in each estrous cycle phase (metestrus, diestrus, proestrus, and estrus) in the different brain areas (cerebellum, prefrontal cortex, and hippocampus) with their respective standard deviation (SD).

	Cerebellum Ratio \pm SD	Prefrontal cortex Ratio \pm SD	Hippocampus Ratio \pm SD
Metestrus	1.9 \pm 0.62*	2.7 \pm 0.54	8.1 \pm 1.75
Diestrus	2.4 \pm 0.71	3.0 \pm 0.95	7.3 \pm 2.90
Proestrus	3.6 \pm 0.83	1.7 \pm 0.35**	6.6 \pm 1.52
Estrus	4.4 \pm 0.91	2.2 \pm 0.34	4.8 \pm 1.27

* $P < 0.023$ metestrus versus estrus, ** $P < 0.029$ diestrus versus proestrus.

showed an inverse expression on diestrus day since LAP1 content increased in this day while that of LAP2 diminished. The shorter isoform LIP did not change its content along the estrous cycle (Figure 3).

The LAP/LIP ratio changes throughout the estrous cycle in a tissue specific manner. In the cerebellum the LAP/LIP ratio increased throughout the estrous cycle from metestrus to estrus ($P < 0.023$ metestrus versus estrus), while in the prefrontal cortex the LAP/LIP ratio decreased during proestrus ($P < 0.029$ diestrus versus proestrus) and then moderately increased on estrus. In the hippocampus, the LAP/LIP ratio slightly diminished during proestrus and estrus, but no statistical significant changes were observed (Table 1).

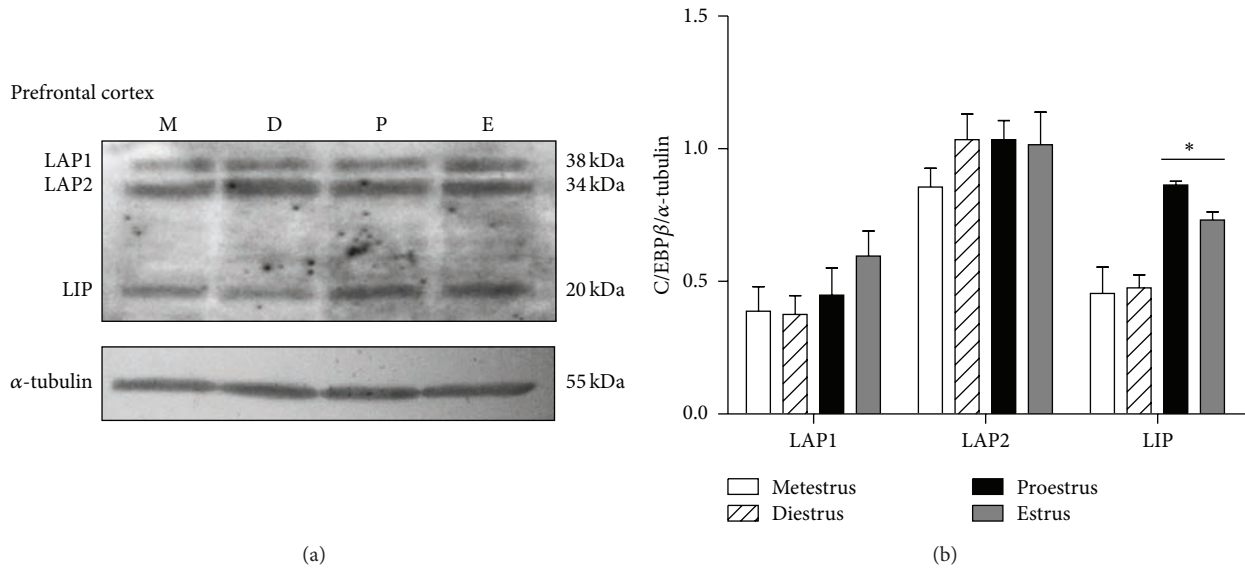


FIGURE 2: $C/EBP\beta$ isoforms content in the rat prefrontal cortex throughout the estrous cycle. (a) A representative western blot for LAPI, LAP2, and LIP isoforms content during metestrus (M), diestrus (D), proestrus (P), and estrus (E). (b) Densitometric analysis of LAPI, LAP2, and LIP content relative to that of α -tubulin. The data represent the mean \pm S.E.M, $n = 6$, * $P < 0.05$ LIP proestrus and estrus versus metestrus and diestrus.

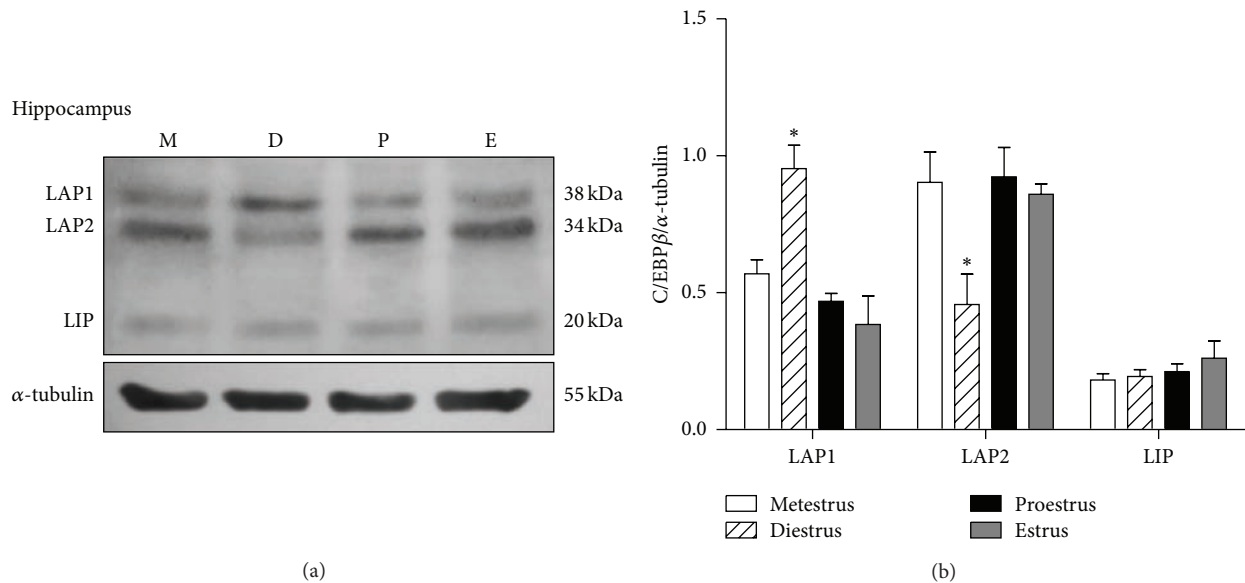


FIGURE 3: $C/EBP\beta$ isoforms content in the rat hippocampus along the estrous cycle. (a) A representative western blot for the three isoforms during metestrus (M), diestrus (D), proestrus (P), and estrus (E). (b) Densitometric analysis of LAPI, LAP2, and LIP content relative to that of α -tubulin. The data represent the mean \pm S.E.M, $n = 6$, * $P < 0.05$ LAPI and LAP2 diestrus versus all the other days.

4. Discussion

This work demonstrates that $C/EBP\beta$ is expressed in different areas of the rat brain and changes its content throughout the estrous cycle. The three $C/EBP\beta$ isoforms LAPI, LAP2, and LIP were detected in the cerebellum, prefrontal cortex, and hippocampus. Cortés-Canteli and coworkers [9] previously

reported the expression of $C/EBP\beta$ in all these regions in the male neonatal rat, but without studying each isoform.

Changes in sex steroid hormone levels throughout the estrous cycle influence brain function and morphology [14, 30–32]. E2 and P4 show a specific concentration pattern throughout the estrous cycle. E2 levels begin to increase during the late diestrus and show a maximum peak during

the morning of proestrus. The increase in estrogen levels is followed by a rise in P4 levels during mid to late proestrus and the early estrus [33, 34]. The fluctuations in C/EBP β isoforms content may depend on changes in E2 and P4 levels and the expression of sex hormone receptors.

In the cerebellum the decrease in LAP2 content during diestrus and proestrus could be due to the increase in E2 levels while the decrease in LIP isoform during proestrus and estrus could be related to the increase in both E2 and P4. The increase in LIP isoform content in the prefrontal cortex could also be induced by E2 and P4. The LAP isoforms change in hippocampus during diestrus could be due to the increasing levels in E2 that precede the high hormone levels observed during proestrus. Many of the effects of sex hormones depend on the actions of ER and PR that modulate target gene expression. These receptors are widely expressed in different brain areas including the cortex, hippocampus, hypothalamus, and cerebellum [35–37]. There is no evidence that C/EBP β is directly regulated by ER and PR, but a microarray study shows that PR can induce C/EBP β expression in breast cancer cells [38]. Nonetheless, more studies are needed using ovariectomized animals and receptor antagonists in order to confirm the direct effect of sex hormones in C/EBP β expression.

In addition to a transcriptional regulation, sex hormones could influence C/EBP β isoforms translation, given that they are translated from a single mRNA [39]. Different signal transduction pathways regulate the function of the translation initiation factors eIF2 and eIF4E, which determine the ratio of C/EBP β isoforms [5]. There is evidence that E2 causes polyribosomes to accumulate in the dendrites of hippocampal neurons suggesting mRNA translation regulation [40]. In rat primary neuronal cultures of hippocampal and cortical regions, E2 increases phosphorylation of ribosomal protein S6 and eIF4E binding protein 1 (4EBP1) through the activation of ERK, and this promotes an increase in dendritic mRNA translation [41]. These studies suggest a possible role of gonadal sex hormones in C/EBP β isoform translation.

Sex hormones modulate the animal behavior through changing the structure and function of different brain areas. Besides mating behavior, female animals show alterations in anxiety, learning, and memory and in the response to stress depending on the estrous cycle phase [34, 42]. E2 and P4 can modulate hippocampal and cortical functions in the rat influencing learning and memory processes [43–45]. High E2 levels during proestrus enhance hippocampal memory consolidation, while in diestrus the animals show impairment in learning and memory [46, 47]. There is evidence that C/EBP β expression in the hippocampus is associated with the consolidation of new memories [48–50]. In our study we observed a change in LAP1/2 isoform expression during diestrus in the hippocampus suggesting a possible role of these isoforms in memory consolidation.

In different cell models, the isoforms ratio is important to determine cell fate and variations in the LAP/LIP ratio can significantly activate or inhibit expression of target genes [51, 52]. The LAP/LIP ratio is therefore an important indicator of C/EBP β transcriptional activity [53]. In rat white adipose tissue, a caloric restriction reduced the LAP/LIP ratio, which

was associated with cell differentiation [54]. In the hepatic glucose metabolism, hyperglycemia increased the LAP/LIP ratio, which in turn promoted an increase in genes associated with gluconeogenesis [55]. Until now there are no data available regarding the hormone regulation of the LAP/LIP ratios in the brain. In the cerebellum, the isoform ratio increases along the estrous cycle suggesting a key role of the LAP isoforms in this brain region and particularly during estrus. In contrast, the low LAP/LIP ratio during metestrus suggests an important function for the LIP isoform. In the prefrontal cortex, the decrease in the LAP/LIP ratio during proestrus suggests an important role of the LIP isoform in regulating gene expression when sex steroid hormone levels are high. Given that this isoform is usually considered as a dominant negative, its increase could downregulate different target genes. In the hippocampus the LAP/LIP ratio appears to decrease from metestrus to estrus, but given the variations in the data no significant changes were observed. However, more studies are needed to understand the actions of C/EBP β isoforms in the brain and the role of sex hormone receptors in the regulation of such actions.

5. Conclusions

This work is the first to describe the expression of the three C/EBP β isoforms in the brain and its changes under physiological conditions during the estrous cycle of the rat. The C/EBP β isoforms expression in the cerebellum, prefrontal cortex, and hippocampus may be regulated by E2 and P4. The LAP and LIP isoforms expression changes throughout the estrous cycle and is tissue-specific. Our work shows important changes in the expression of C/EBP β isoforms during the estrous cycle that might be relevant to the female reproductive adaptation.

Conflict of Interests

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

Acknowledgment

The authors want to thank Norman Leonardo Aguilar Rosas for his help during the estrous cycle evaluation.

References

- [1] J. Tsukada, Y. Yoshida, Y. Kominato, and P. E. Auron, "The CCAAT/enhancer (C/EBP) family of basic-leucine zipper (bZIP) transcription factors is a multifaceted highly-regulated system for gene regulation," *Cytokine*, vol. 54, no. 1, pp. 6–19, 2011.
- [2] D. P. Ramji and P. Foka, "CCAAT/enhancer-binding proteins: structure, function and regulation," *Biochemical Journal*, vol. 365, no. 3, pp. 561–575, 2002.
- [3] M. Niehof, S. Kubicka, L. Zender, M. P. Manns, and C. Trautwein, "Autoregulation enables different pathways to control CCAAT/enhancer binding protein beta (C/EBP beta)

- transcription,” *Journal of Molecular Biology*, vol. 309, no. 4, pp. 855–868, 2001.
- [4] P. Descombes and U. Schibler, “A liver-enriched transcriptional activator protein, LAP, and a transcriptional inhibitory protein, LIP, are translated from the same mRNA,” *Cell*, vol. 67, no. 3, pp. 569–579, 1991.
 - [5] C. F. Calkhoven, C. Müller, and A. Leutz, “Translational control of C/EBP α and C/EBP β isoform expression,” *Genes & Development*, vol. 14, no. 15, pp. 1920–1932, 2000.
 - [6] C. A. Zahnaw, “CCAAT/enhancer-binding protein β : its role in breast cancer and associations with receptor tyrosine kinases,” *Expert Reviews in Molecular Medicine*, vol. 11, article e12, 2009.
 - [7] D. Aguilar-Morante, M. Cortes-Canteli, M. Sanz-Sancristobal, A. Santos, and A. Perez-Castillo, “Decreased CCAAT/enhancer binding protein β expression inhibits the growth of glioblastoma cells,” *Neuroscience*, vol. 176, pp. 110–119, 2011.
 - [8] E. Sterneck and P. F. Johnson, “CCAAT/enhancer binding protein beta is a neuronal transcriptional regulator activated by nerve growth factor receptor signaling,” *Journal of Neurochemistry*, vol. 70, no. 6, pp. 2424–2433, 1998.
 - [9] M. Cortés-Canteli, M. Pignatelli, A. Santos, and A. Perez-Castillo, “CCAAT/enhancer-binding protein β plays a regulatory role in differentiation and apoptosis of neuroblastoma cells,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 277, no. 7, pp. 5460–5467, 2002.
 - [10] M. Cortés-Canteli, D. Aguilar-Morante, M. Sanz-SanCristobal, D. Megias, A. Santos, and A. Perez-Castillo, “Role of C/EBP β transcription factor in adult hippocampal neurogenesis,” *PLoS ONE*, vol. 6, no. 10, Article ID e24842, 2011.
 - [11] E. Peña-Altamira, E. Polazzi, E. Moretto, M. Lauriola, and B. Monti, “The transcription factor CCAAT enhancer-binding protein β protects rat cerebellar granule neurons from apoptosis through its transcription-activating isoforms,” *European Journal of Neuroscience*, vol. 39, no. 2, pp. 176–185, 2014.
 - [12] S. Nadeau, P. Hein, K. J. L. Fernandes, A. C. Peterson, and F. D. Miller, “A transcriptional role for C/EBP β in the neuronal response to axonal injury,” *Molecular and Cellular Neuroscience*, vol. 29, no. 4, pp. 525–535, 2005.
 - [13] A. González-Arenas, A. G. Piña-Medina, O. González-Flores et al., “Expression pattern of Tau in the rat brain during pregnancy and the beginning of lactation,” *Brain Research Bulletin*, vol. 89, no. 3–4, pp. 108–114, 2012.
 - [14] B. S. McEwen, “Sex, stress and the brain: interactive actions of hormones on the developing and adult brain,” *Climacteric*, vol. 17, no. S2, pp. 18–25, 2014.
 - [15] J. J. Tuscher, A. M. Fortress, J. Kim, and K. M. Frick, “Regulation of object recognition and object placement by ovarian sex steroid hormones,” *Behavioural Brain Research*, vol. 285, pp. 140–157, 2014.
 - [16] E. Cabrera-Muñoz, A. González-Arenas, M. Saqui-Salces et al., “Regulation of progesterone receptor isoforms content in human astrocytoma cell lines,” *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 113, no. 1–2, pp. 80–84, 2009.
 - [17] J. D. Blaustein, “Steroid hormone receptors: long- and short-term integrators of the internal milieu and the external environment,” *Hormone and Metabolic Research*, vol. 44, no. 8, pp. 563–568, 2012.
 - [18] O. T. Hernández-Hernández, T. K. González-García, and I. Camacho-Arroyo, “Progesterone receptor and SRC-1 participate in the regulation of VEGF, EGFR and Cyclin D1 expression in human astrocytoma cell lines,” *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 132, no. 1–2, pp. 127–134, 2012.
 - [19] M. R. Foy, M. Baudry, G. K. Akopian, and R. F. Thompson, “Regulation of hippocampal synaptic plasticity by estrogen and progesterone,” *Vitamins & Hormones*, vol. 82, pp. 219–239, 2010.
 - [20] M. K. Bagchi, S. R. Mantena, A. Kannan, and I. C. Bagchi, “Control of uterine cell proliferation and differentiation by C/EBP β : functional implications for establishment of early pregnancy,” *Cell Cycle*, vol. 5, no. 9, pp. 922–925, 2006.
 - [21] A. Kannan, A. T. Fazleabas, I. C. Bagchi, and M. K. Bagchi, “The transcription factor C/EBP β is a marker of uterine receptivity and expressed at the implantation site in the primate,” *Reproductive Sciences*, vol. 17, no. 5, pp. 434–443, 2010.
 - [22] S. R. Mantena, A. Kannan, Y.-P. Cheon et al., “C/EBP β is a critical mediator of steroid hormone-regulated cell proliferation and differentiation in the uterine epithelium and stroma,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 103, no. 6, pp. 1870–1875, 2006.
 - [23] H.-Y. Fan, Z. Liu, P. F. Johnson, and J. S. Richards, “CCAAT/enhancer-binding proteins (C/EBP)- α and β are essential for ovulation, luteinization, and the expression of key target genes,” *Molecular Endocrinology*, vol. 25, no. 2, pp. 253–268, 2011.
 - [24] G. W. Robinson, P. F. Johnson, L. Hennighausen, and E. Sterneck, “The C/EBPbeta transcription factor regulates epithelial cell proliferation and differentiation in the mammary gland,” *Genes and Development*, vol. 12, no. 12, pp. 1907–1916, 1998.
 - [25] B. Raught, W. S.-L. Liao, and J. M. Rosen, “Developmentally and hormonally regulated CCAAT/enhancer-binding protein isoforms influence β -casein gene expression,” *Molecular Endocrinology*, vol. 9, no. 9, pp. 1223–1232, 1995.
 - [26] M. Christian, Y. Pohnke, R. Kempf, B. Gellersen, and J. A. N. J. Brosens, “Functional association of PR and CCAAT/enhancer-binding protein β isoforms: promoter-dependent cooperation between PR-B and liver-enriched inhibitory protein, or liver-enriched activatory protein and PR-A in human endometrial stromal cells,” *Molecular Endocrinology*, vol. 16, no. 1, pp. 141–154, 2002.
 - [27] J. Dong, C.-H. Tsai-Morris, and M. L. Dufau, “A novel estradiol/estrogen receptor alpha-dependent transcriptional mechanism controls expression of the human prolactin receptor,” *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 281, no. 27, pp. 18825–18836, 2006.
 - [28] C. Clementi, S. K. Tripurani, M. J. Large et al., “Activin-like kinase 2 functions in peri-implantation uterine signaling in mice and humans,” *PLoS Genetics*, vol. 9, no. 11, Article ID e1003863, 2013.
 - [29] G. Paxinos and C. Watson, *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, Academic Press, 6th edition, 2006.
 - [30] C. Arias, A. Zepeda, K. Hernández-Ortega, P. Leal-Galicia, C. Lojero, and I. Camacho-Arroyo, “Sex and estrous cycle-dependent differences in glial fibrillary acidic protein immunoreactivity in the adult rat hippocampus,” *Hormones and Behavior*, vol. 55, no. 1, pp. 257–263, 2009.
 - [31] O. Villamar-Cruz, J. Manjarrez-Marmolejo, R. Alvarado, and I. Camacho-Arroyo, “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 Research Bulletin*, vol. 69, no. 3, pp. 276–281, 2006.
 - [32] A. A. Rasia-Filho, F. Dalpian, I. C. Menezes, J. Brusco, J. E. Moreira, and R. S. Cohen, “Dendritic spines of the medial amygdala: plasticity, density, shape, and subcellular modulation by sex steroids,” *Histology and Histopathology*, vol. 27, no. 8, pp. 985–1011, 2012.

- [33] C. L. Chaffin and C. A. Vandevoort, "Follicle growth, ovulation, and luteal formation in primates and rodents: a comparative perspective," *Experimental Biology and Medicine*, vol. 238, no. 5, pp. 539–548, 2013.
- [34] J. Simpson and J. P. Kelly, "An investigation of whether there are sex differences in certain behavioural and neurochemical parameters in the rat," *Behavioural Brain Research*, vol. 229, no. 1, pp. 289–300, 2012.
- [35] S. L. Dean and M. M. McCarthy, "Steroids, sex and the cerebellar cortex: implications for human disease," *Cerebellum*, vol. 7, no. 1, pp. 38–47, 2008.
- [36] C. Guerra-Araiza, A. Coyoy-Salgado, and I. Camacho-Arroyo, "Sex differences in the regulation of progesterone receptor isoforms expression in the rat brain," *Brain Research Bulletin*, vol. 59, no. 2, pp. 105–109, 2002.
- [37] H. Ozawa, "Steroid hormones, their receptors and neuroendocrine system," *Journal of Nippon Medical School*, vol. 72, no. 6, pp. 316–325, 2005.
- [38] J. K. Richer, B. M. Jacobsen, N. G. Manning, M. G. Abel, D. M. Wolf, and K. B. Horwitz, "Differential gene regulation by the two progesterone receptor isoforms in human breast cancer cells," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 277, no. 7, pp. 5209–5218, 2002.
- [39] D. S. Peeper, "C/EBP β : lost beyond translation," *EMBO Journal*, vol. 30, no. 18, pp. 3663–3664, 2011.
- [40] J. B. McCarthy and T. A. Milner, "Dendritic ribosomes suggest local protein synthesis during estrous synaptogenesis," *NeuroReport*, vol. 14, no. 10, pp. 1357–1360, 2003.
- [41] S. N. Sarkar, L. T. Smith, S. M. Logan, and J. W. Simpkins, "Estrogen-induced activation of extracellular signal-regulated kinase signaling triggers dendritic resident mRNA translation," *Neuroscience*, vol. 170, no. 4, pp. 1080–1085, 2010.
- [42] A. Gouveia Jr., U. D. dos Santos, F. E. Felisbino, T. L. de Afonseca, G. Antunes, and S. Morato, "Influence of the estrous cycle on the behavior of rats in the elevated T-maze," *Behavioural Processes*, vol. 67, no. 2, pp. 167–171, 2004.
- [43] L. A. Bean, L. Ianov, and T. C. Foster, "Estrogen receptors, the hippocampus, and memory," *The Neuroscientist*, vol. 20, no. 5, pp. 534–545, 2014.
- [44] A. A. Walf, M. E. Rhodes, and C. A. Frye, "Ovarian steroids enhance object recognition in naturally cycling and ovariectomized, hormone-primed rats," *Neurobiology of Learning and Memory*, vol. 86, no. 1, pp. 35–46, 2006.
- [45] A. Kato, Y. Hojo, S. Higo et al., "Female hippocampal estrogens have a significant correlation with cyclic fluctuation of hippocampal spines," *Frontiers in Neural Circuits*, vol. 7, article 149, 2013.
- [46] J. D. Cushman, M. D. Moore, R. W. Olsen, and M. S. Fanselow, "The role of the δ GABA(A) receptor in ovarian cycle-linked changes in hippocampus-dependent learning and memory," *Neurochemical Research*, vol. 39, no. 6, pp. 1140–1146, 2014.
- [47] M. I. Boulware, J. D. Heisler, and K. M. Frick, "The memory-enhancing effects of hippocampal estrogen receptor activation involve metabotropic glutamate receptor signaling," *The Journal of Neuroscience*, vol. 33, no. 38, pp. 15184–15194, 2013.
- [48] S. M. Taubenfeld, M. H. Milekic, B. Monti, and C. M. Alberini, "The consolidation of new but not reactivated memory requires hippocampal C/EBP β ," *Nature Neuroscience*, vol. 4, no. 8, pp. 813–818, 2001.
- [49] M. Merhav, S. Kuulmann-Vander, A. Elkobi, S. Jacobson-Pick, A. Karni, and K. Rosenblum, "Behavioral interference and C/EBP β expression in the insular-cortex reveal a prolonged time period for taste memory consolidation," *Learning and Memory*, vol. 13, no. 5, pp. 571–574, 2006.
- [50] M. H. Milekic, G. Pollonini, and C. M. Alberini, "Temporal requirement of C/EBP β in the amygdala following reactivation but not acquisition of inhibitory avoidance," *Learning and Memory*, vol. 14, no. 7, pp. 504–511, 2007.
- [51] T. Luedde, M. Duderstadt, K. L. Streetz et al., "C/EBP β isoforms LIP and LAP modulate progression of the cell cycle in the regenerating mouse liver," *Hepatology*, vol. 40, no. 2, pp. 356–365, 2004.
- [52] Q. Wang, H. Hui, H. Yang et al., "Involvement of C/EBP β in monocytic differentiation of acute myeloid leukemia cells induced by LW-218, a new synthesized flavonoid," *Neoplasma*, vol. 61, no. 6, pp. 647–658, 2014.
- [53] C. A. Zahnow, "CCAAT/enhancer binding proteins in normal mammary development and breast cancer," *Breast Cancer Research*, vol. 4, no. 3, pp. 113–121, 2002.
- [54] M. Zhu, G. D. Lee, L. Ding et al., "Adipogenic signaling in rat white adipose tissue: modulation by aging and calorie restriction," *Experimental Gerontology*, vol. 42, no. 8, pp. 733–744, 2007.
- [55] J. Shao, L. Qiao, R. C. Janssen, M. Pagliassotti, and J. E. Friedman, "Chronic hyperglycemia enhances PEPCK gene expression and hepatocellular glucose production via elevated liver activating protein/liver inhibitory protein ratio," *Diabetes*, vol. 54, no. 4, pp. 976–984, 2005.

12.2. Capítulos de libros



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Medicina

Departamento de Bioquímica

Facultad de Medicina



MENSAJE

BIOQUÍMICO

XXXVIII

Editores: A. Butanda, A. Guevara, J. Guevara, D. Matuz, R. Lara y P. Torres

Vol. XXXVIII, 2014

ISSN 0188-137X

MENSAJE BIOQUÍMICO

EDITORES:

ARMANDO BUTANDA OCHOA

ALBERTO GUEVARA FLORES

JORGE GUEVARA FONSECA

DEYAMIRA MATUZ MARES

ROBERTO LARA LEMUS

PATRICIA VICTORIA TORRES DURÁN

**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.**

VOL. XLI

2014

5 de junio de 2014 a 4 junio de 2015



Butanda Ochoa A, Guevara Flores A, Guevara Fonseca J, Matuz Mares D, Lara Lemus R, Torres Durán PV. **Mensaje Bioquímico**, Vol. XLI, 127-144, Depto de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd. Universitaria, México, D.F, MÉXICO. (2014).
(<http://bq.unam.mx/comitetab/TAB2014>)

(ISSN-0188-137X)

PAPEL DE LAS HORMONAS SEXUALES EN EL CRECIMIENTO DE TUMORES CEREBRALES HUMANOS

ROLE OF SEX HORMONES IN THE GROWTH OF HUMAN BRAIN TUMORS

Valeria Hansberg-Pastor, Aliesha González-Arenas, Ignacio Camacho-Arroyo

Facultad de Química, Departamento de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad Núm. 3000, Universidad Nacional Autónoma de México, C.U., Coyoacán, 04510, México, D.F., México.

Resumen

Las hormonas sexuales regulan diferentes funciones en las células mediante la interacción con sus receptores intracelulares, los cuales son factores de transcripción activados por ligando. Estos receptores regulan la expresión de genes involucrados en el crecimiento y proliferación de las células, por lo que se han asociado al desarrollo tumoral. Los tumores primarios del Sistema Nervioso Central más frecuentes en adultos son los astrocitomas y los meningiomas, mientras que en niños son los meduloblastomas. La importancia de las hormonas sexuales en el desarrollo de estos tumores se ha estudiado debido a su incidencia dependiente del género, la presencia de los receptores a estas hormonas y los

efectos inhibidores de los antagonistas de los receptores hormonales sobre la proliferación tumoral. De acuerdo a los datos reportados, las hormonas sexuales juegan un papel importante en el desarrollo tumoral, ya que en general se ha observado que incrementan la proliferación e invasividad celulares. Además, el nivel de expresión de sus receptores se considera un factor de pronóstico y los antagonistas de los receptores prometen ser una alternativa terapéutica contra los distintos tumores cerebrales. Sin embargo, todavía se requieren estudios epidemiológicos, clínicos y experimentales con el fin de diseñar posibles estrategias terapéuticas basadas en el conocimiento de las acciones de las hormonas sexuales en los tumores cerebrales.

Palabras clave: estradiol, progesterona, astrocitomas, meningiomas, meduloblastomas

Abstract

Sex hormones regulate different cell functions through the interaction with their nuclear receptors, which are ligand activated transcription factors. Sex hormone receptors have been strongly associated with tumor development, since they activate genes involved in cell growth and proliferation. The most frequent primary brain tumors in adults are astrocytomas and meningiomas, while in children the most frequent tumors are medulloblastomas. The relevance of sex hormones in tumor development has been studied based on the gender dependent incidence, the expression of sex hormone receptors and the effects of receptor antagonist on tumor cell proliferation. According to the reported data, sex hormones play an important role in tumor growth and development since they increase cell proliferation and invasion. Besides, the expression level of their receptors is considered an important prognosis factor, and the sex hormone receptor antagonists represent a promising therapy alternative. Nevertheless, several epidemiologic, clinical and experimental researches need to be done in order to improve therapeutic strategies for the different brain tumors.

Keywords: estradiol, progesterone, astrocytomas, meningiomas, medulloblastomas

Las hormonas sexuales y su mecanismo de acción

Las hormonas esteroides sexuales son moléculas derivadas del colesterol que se sintetizan en diversos órganos como son las gónadas, las glándulas adrenales y el Sistema Nervioso Central (SNC). Las hormonas sexuales más importantes son los estrógenos, progestágenos y andrógenos de los cuales los principales derivados activos son el estradiol (E2), la progesterona (P4) y la testosterona (T). Estas hormonas participan en diversos procesos fisiológicos entre los que se destaca la reproducción, aunque también participan en procesos no reproductivos como la memoria y el aprendizaje, la neuroprotección y la respuesta inmune, así como el crecimiento tumoral.

Las hormonas sexuales tienen múltiples células blanco sobre las cuales ejercen sus efectos a través de la interacción con sus receptores intracelulares, los cuales son factores de transcripción activados por ligando. Estos receptores pertenecen a la superfamilia de receptores nucleares y comprende a los receptores a estrógenos α y β (RE α/β), los receptores a progesterona (RP-A y RP-B) y el receptor a andrógenos (RA) [1, 2]. El mecanismo de acción clásico o genómico de los receptores intracelulares involucra la inducción de la expresión génica. En ausencia de hormona los receptores se encuentran asociados a diversas proteínas como las de choque térmico (Hsp70/90) y en una conformación específica que les permite unir a la hormona con gran afinidad [3]. Las hormonas entran por difusión simple a la célula e interactúan con su receptor intracelular, lo que provoca un cambio conformacional en el receptor que promueve la disociación de sus proteínas chaperonas, la dimerización y fosforilación. El receptor activo se une a elementos de respuesta a hormonas localizados en las regiones reguladoras de los genes blanco y modulan su expresión mediante el reclutamiento de moléculas correguladoras (SRC-1 y CBP/p300) y de la maquinaria basal de la transcripción (Figura 1).

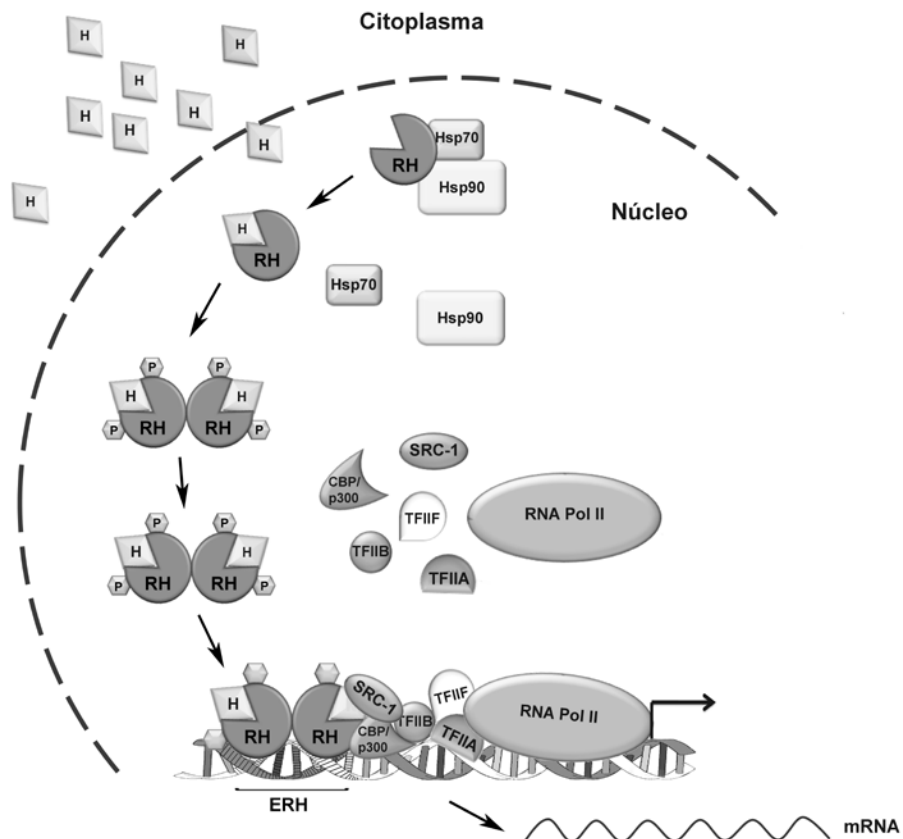


Figura 1. Mecanismo de acción clásico de las hormonas sexuales. En ausencia de hormona (H) el receptor hormonal (RH) se encuentra asociado a proteínas chaperonas como las de choque térmico Hsp70/90. Cuando la hormona entra a la célula y se une a su receptor, éste se disocia del complejo Hsp, se dimeriza y se fosforila (P). Una vez activo se une a elementos de respuesta a hormona (ERH) localizados en las regiones reguladoras de los genes blanco y recluta coactivadores (SCR-1 y CBP/p300) y a la maquinaria basal de la transcripción (RNA pol II, TFIIF, TFIIA/B/F) para inducir la expresión génica.

No obstante, estos receptores también pueden activar la transcripción al unirse al DNA de manera indirecta a través de factores de transcripción como las proteínas Sp1 y AP-1 [2, 4–6]. Una vez concluido el proceso de transcripción, los receptores son degradados a través de la vía ubiquitina-proteosoma [7, 8]. Por otro lado, las hormonas sexuales también tienen efectos no genómicos los cuales involucran a receptores membranales capaces de activar diversas cascadas de señalización [9]. En este trabajo nos enfocaremos en la importancia de los efectos de las hormonas sexuales y la expresión de sus receptores intracelulares en el desarrollo de tumores cerebrales.

Tumores primarios del Sistema Nervioso Central

Los tumores primarios del SNC conforman un grupo muy heterogéneo de tumores sólidos que surgen en distintas áreas del cerebro, tienen diferente potencial invasivo y un pronóstico variable. Entre los tumores del SNC, los gliomas y los meningiomas representan el 70% de los tumores primarios en adultos, mientras que los meduloblastomas representan el 15-20% de todos los tumores pediátricos. La etiología de estos tumores se desconoce y hasta el momento se han determinado como factores de riesgo a la radiación ionizante y algunos síndromes genéticos [10, American Brain Tumor Association www.abta.org]. De acuerdo a estudios clínicos, experimentales y epidemiológicos se ha sugerido que las hormonas sexuales juegan un papel importante en el desarrollo de estos tumores [10]. En los siguientes apartados se hará una breve revisión de los avances reportados sobre los efectos de las hormonas sexuales en los astrocitomas, meningiomas y meduloblastomas.

Astrocitomas

Los astrocitomas derivan de células gliales astrocíticas o de células troncales cancerosas, representan el 75% de todos los gliomas y son los tumores primarios más frecuentes y agresivos del SNC [11–13]. La frecuencia de los astrocitomas entre hombres y mujeres es de 3:2, observada principalmente en los tumores de mayor evolución [14]. Los astrocitomas están clasificados por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en cuatro grados (I-IV) de acuerdo a sus características histológicas. Los tumores de grado I son localizados y pueden ser eliminados por resección quirúrgica. Sin embargo, los astrocitomas de grados II y III presentan infiltración hacia el parénquima, por lo que se pueden volver mortales más rápidamente. Por último, los tumores de grado IV, también llamados glioblastomas, se les considera el tipo de glioma más agresivo, pues son letales en un lapso de 12 meses y son los más frecuentes, representando un 60% de todos los casos de astrocitomas. Las terapias para los astrocitomas de grados II-IV son la cirugía seguida de quimio y/o la radioterapia [11, 12, 15–17]. Sin embargo, estas terapias son poco eficientes para los tumores de mayor malignidad, pues la supervivencia de los pacientes es muy baja y la recurrencia de los tumores muy elevada. La expresión de los receptores a hormonas sexuales en astrocitomas [18, 19] ha sugerido la terapia hormonal como una alternativa terapéutica.

Los efectos del E2 sobre el crecimiento de los astrocitomas se han estudiado en modelos tanto *in vitro* como *in vivo*. En estudios con xenoinjertos se encontró que los ratones hembra sobreviven más que los machos debido a la presencia de los estrógenos [20]. También se ha reportado que el tratamiento con el metabolito del E2, 2-metoxiestradiol, induce muerte celular en líneas derivadas de gliomas humanos e inhibe el crecimiento del tumor en un modelo de glioma de ratón [21, 22]. De acuerdo a estos datos, el E2 podría tener un efecto de neuroprotección como se ha sugerido para patologías como el Alzheimer [23]. Sin embargo, se ha encontrado que líneas celulares de glioblastoma humano y de rata expresan la aromatasa, enzima encargada de la biosíntesis del E2. Esta enzima se expresa en condiciones fisiológicas, por lo que su presencia en células tumorales indica un papel importante de los estrógenos en el desarrollo del tumor [24].

Los estudios de la expresión del RE en astrocitomas son controvertidos. La expresión del RE se pierde en biopsias de astrocitomas humanos conforme incrementa el grado de evolución del tumor [25–27], mientras que sí se ha detectado en líneas celulares derivadas de astrocitomas de alto grado de malignidad [24, 28, 29]. Con respecto a las isoformas del receptor, el RE α se expresa en astrocitos y en tumores de bajo grado de malignidad y su expresión se pierde durante el desarrollo tumoral [30]. Sin embargo, en líneas celulares derivadas de astrocitomas humanos de grados III (U373) y IV (D54) se encontró que el E2 promueve el crecimiento de las células mediante el RE α y el RE β . El RE α antagonista del receptor (ICI 182,780) bloquea el efecto de la hormona. Además, el RE α promueve la expresión de genes importantes para la proliferación celular como el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) y la ciclina D1 [29]. En cuanto al RE β se ha reportado que se encuentra altamente expresado en astrocitomas de bajo grado de malignidad y que disminuye su expresión conforme aumenta el grado de evolución, por lo que se propone como un posible supresor de tumores [27, 31]. No obstante, otros estudios han identificado al RE β como la isoforma predominante en glioblastomas y un antagonista específico (liquiritigenina) inhibe la proliferación de los astrocitomas tanto *in vitro* como *in vivo* [31, 32]. Esto indica una gran heterogeneidad en la expresión del RE β en las células de glioblastomas y sugiere un papel relevante del receptor en el desarrollo de los tumores.

Además del RE se ha reportado que la P4 y sus receptores intracelulares juegan un papel importante en el crecimiento de los astrocitomas. Durante el embarazo, los niveles elevados de P4 promueven el crecimiento tumoral y tras el parto se reduce el tamaño del astrocitoma [33, 34]. El tratamiento con una

concentración fisiológica de P4 (10 nM) induce la proliferación de las líneas celulares U373 y D54, mientras que el antagonista del RP, mifepristona (RU486), bloquea el efecto de la hormona [35]. Estos efectos se deben a la regulación por P4 de genes importantes para la proliferación y metástasis como son VEGF, EGFR y ciclina D1 [36]. Contrario a estos resultados, Altinoz y colaboradores reportaron que la progestina medroxiprogesterona arresta en la fase S del ciclo celular a las células C6 de glioma de rata [37]. En estudios con xenoinjertos se encontró que el tratamiento con el antagonista RU486 reduce el tamaño del tumor [38] e inhibe el crecimiento de líneas celulares de glioblastoma [39]. Además, se ha sugerido como posible adyuvante para incrementar la eficiencia de la quimio y radioterapia empleada para el tratamiento de los astrocitomas [40].

La expresión del RP se correlaciona de manera directa con el grado de evolución de los astrocitomas, lo que sugiere que el RP tiene un fuerte potencial oncogénico en estos tumores [41]. Estudios por inmunohistoquímica muestran que los astrocitomas de grados III y IV expresan el RP en mayor proporción que los de grados I y II y que la isoforma predominante es RP-B [25, 26, 42, 43]. En líneas celulares de astrocitomas se ha encontrado una expresión diferencial de las isoformas del RP, pues en la línea U373 (grado III) se encontró una relación RP-B:RP-A de 3:1, mientras que en las células D54 (grado IV) se encontró una proporción equivalente [44, 45]. La tasa de expresión de las isoformas es importante, pues la P4 puede tener diversos efectos dependiendo del patrón de expresión de las mismas [46]. En cáncer de mama se ha reportado que los tumores que sobre-expresan RP-A tienen un peor pronóstico [47]. En cambio, en astrocitomas la sobre-expresión de RP-A inhibe el crecimiento de las células U373 tratadas con P4, lo que sugiere un posible efecto anti-proliferativo de esta isoforma [44]. Incluso, en biopsias de astrocitomas se encontró una relación inversamente proporcional entre la expresión de RP-A y el marcador de proliferación Ki-67 [43].

La expresión del RP es regulada por E2 en distintos tejidos como el útero, la glándula mamaria y el cerebro. Esta regulación se debe a la presencia de medios elementos de respuesta a estrógenos en el promotor del gen del RP. En cáncer de mama se ha reportado que el E2 induce principalmente la expresión de RP-B en células T47D y promueve la expresión de RP-A en células MCF7 [46]. En líneas celulares de astrocitomas humanos el RP se regula por E2, ya que el tratamiento con E2 (10n nM) incrementó el contenido de las isoformas del RP en las células U373, pero en la línea celular D54 no tuvo un efecto significativo. El contenido de las isoformas del RP no se modifica al tratar a las células con P4 (10 nM), pero se reduce su contenido, y en particular de la isoforma RP-A, al emplear

un tratamiento conjunto de E2 y P4 [44]. Estos estudios indican que en astrocitomas humanos el RP es regulado por E2, pero que su regulación puede variar de acuerdo al contexto celular y al grado de evolución del tumor.

Meningiomas

Los meningiomas son tumores que se originan principalmente de las células que forman la capa aracnoides y que cubren el cerebro y la médula espinal. Se estima que los meningiomas representan un 13-26% de todos los tumores primarios del SNC y la gran mayoría son tumores benignos, clasificados histológicamente por la OMS como grado I. No obstante, hay una baja incidencia de meningiomas atípicos (5-7%) clasificados como grado II y en algunos casos se presentan meningiomas malignos de grado III (2%). La incidencia de meningiomas incrementa con la edad, son más frecuentes en adultos de 60-70 años de edad y hay una mayor prevalencia en mujeres que en hombres en una proporción de 2:1. Los meningiomas son tumores de lento crecimiento y tienen un buen pronóstico, pues la supervivencia relativa mayor a los 5 años es de un 80% y permanece elevada (70%) incluso hasta los 15 años post-diagnóstico. La gran mayoría de los meningiomas pueden ser curados por resección quirúrgica total o tratados con radioterapia tras una resección parcial. Sin embargo, una edad avanzada y ser de género masculino son factores de pronóstico desfavorable [48, 49], lo que sugiere la participación de las hormonas sexuales en el desarrollo de estos tumores.

El efecto de las hormonas sexuales en el desarrollo y crecimiento de los meningiomas es controvertido. En estudios epidemiológicos se encontró que no existe mayor riesgo de presentar meningiomas en mujeres que hayan utilizado terapias anticonceptivas y de reemplazo hormonal [50]. En cambio, en un estudio retrospectivo se encontró una asociación positiva entre el uso de terapia de reemplazo hormonal y el diagnóstico de meningioma [51] así como un agravamiento reversible de los síntomas durante el embarazo [52].

La acción de los estrógenos y la expresión del RE ha sido poco estudiada y en general se considera que los meningiomas son RE negativos [53]. No obstante, por RT-PCR se ha reportado la expresión de ambas isoformas del receptor, RE α y RE β [54]. También se han reportado variantes que carecen de los exones 4 o 5 y que son transcripcionalmente inactivas (RE Δ 4) o que son incapaces de unir a la hormona (RE Δ 5), pero se desconoce su relevancia en el desarrollo tumoral [55]. El RE no se encuentra expresado en meninges sanas, pero sí en meningiomas de grado I y éstos tienen una mayor expresión que los tumores de mayor grado de

evolución. Esto podría sugerir al RE como un marcador de buen pronóstico [56–58]. Por otro lado, la aromatasa se expresa en tejido sano, pero no en meningiomas [58], lo que apunta a una posible pérdida de producción de E2 durante el desarrollo tumoral y una disminución consecuente de la expresión del RE en tumores malignos.

A pesar de que la participación de los estrógenos en el desarrollo de los meningiomas es debatida, la expresión del RP se ha considerado como un factor de pronóstico relevante. Es por ello que se han sugerido terapias para disminuir el crecimiento tumoral utilizando antagonistas del RP como el RU486, el cual se sabe que controla el crecimiento y reduce el tamaño del tumor en pacientes con meningiomas no resectados o recurrentes. El tratamiento a corto y largo plazo es bien tolerado por los pacientes, aunque se han reportado algunos efectos secundarios como la hiperplasia endometrial [59, 60]. En un modelo con ratones desnudos e implantados con células de meningioma, el tratamiento con RU486 redujo el volumen del tumor [61]. A pesar de que el RU486 no es empleado cotidianamente en la clínica, los estudios apuntan a ser utilizado como terapia adyuvante. En cultivos primarios de meningioma, el tratamiento con concentraciones crecientes de RU486 inhibe el crecimiento de las células, pero el efecto del antagonista es independiente de la expresión del RP y el tratamiento con 1 y 10 nM de P4 no induce el crecimiento de las células [61, 62]. Los estudios en cultivos *in vitro* de células derivadas de meningioma son escasos, pues al parecer se pierde la expresión del RP bajo estas condiciones [53, 63].

El RP se expresa en tejido sano en los cistos aracnoides y en las granulaciones aracnoideas [58, 64], lo que podría relacionarse con el hecho de que el 80% de los meningiomas son positivos para el RP. La expresión del RP es más frecuente y abundante en pacientes mujeres con meningioma que en hombres [49, 53], aunque se reportó una elevada expresión en hombres menores de 50 años [65]. En meningiomas malignos, la ausencia del RP está asociada a una elevada proliferación, un aumento en la apoptosis y una mayor recurrencia [66–68]. En un estudio con microarreglos donde examinaron el patrón de expresión génica asociado a la presencia de los receptores a hormonas sexuales se encontró que los genes localizados en el brazo largo del cromosoma 22 se encuentran sobre-expresados en tumores positivos para RP. En esa región se encuentra el gen de la neurofibromatosis tipo 2 (NF2), que mutado, es uno de los factores fundamentales para el desarrollo de la enfermedad [69, 70]. Estos datos sugieren que el RP podría participar en el inicio del desarrollo tumoral. Por otro lado, estudios en meningiomas de la médula espinal han reportado que el 86% de los tumores inmunopositivos para RP correlacionan con la expresión de la

metaloproteinasa MMP-9 [71], lo que indica que el RP podría promover la capacidad invasiva de las células.

La tasa de expresión de las isoformas del RP ha sido muy poco estudiada en estos tumores. Verheijen y colaboradores reportaron que la mayoría de los meningiomas RP positivos expresan más RP-A que RP-B [72]. Sin embargo, un año más tarde se reportó que la expresión de las isoformas del RP es equivalente [43]. En ambos casos no se determinó el grado de evolución del tumor, lo que podría alterar la tasa de expresión de ambas isoformas. Con respecto a la regulación de la expresión del RP, el grupo de Blankenstein ha buscado la posible participación de las isoformas truncas del RE (~~RE4~~ y REΔ5) en este proceso, pero al parecer la regulación del RP no está mediada por estrógenos como se ha reportado ampliamente para cáncer de mama [53]. Otros trabajos apuntan a la participación de otros factores, ya que la expresión de los coactivadores de receptores a hormonas esteroides SRC-1 y TIF2 correlaciona con la expresión del RP en estos tumores [73].

Meduloblastomas

Los meduloblastomas son tumores de rápido crecimiento que derivan de células precursoras del neuroectodermo y se desarrollan principalmente en el cerebelo (80% en el vermis y 20% en los hemisferios cerebelares) y con menos frecuencia en la corteza [74]. Representan el 2% del total de los tumores cerebrales y el 18% de los tumores pediátricos, por lo que son los tumores más frecuentes en la infancia, adolescencia y juventud. La incidencia anual es de 5 a 10 casos por millón de niños de entre 0 y 14 años de edad con un pico máximo hacia los 5 años de edad y un leve predominio en el género masculino [75, 76]. Estos tumores tienen una fuerte tendencia a diseminarse a lo largo del SNC, particularmente hacia el fluido cerebroespinal y las meninges, aunque se han encontrado metástasis fuera del SNC como en la médula ósea. La OMS ha clasificado a los meduloblastomas en cinco subtipos: clásicos, anaplásicos, meduloblastomas de células grandes, desmoplásicos nodulares y meduloblastomas con nodularidad extensiva [77]. Actualmente se ha propuesto una clasificación basada en la separación de subtipos celulares dividiendo a los tumores anaplásicos y de células grandes de los nodulares [78]. La malignidad de los meduloblastomas depende de la edad del paciente, el estatus metastásico y la presencia o ausencia de anaplasia difusa. Los pacientes con meduloblastoma considerados de riesgo promedio son los niños con más de tres años de edad, con

el tumor localizado y de subtipo no anaplásico, el resto de los pacientes que no presentan estas características se consideran de alto riesgo [79]. Clásicamente, los pacientes son tratados mediante escisión quirúrgica del tumor primario con radioterapia local y extensiva sobre el conjunto del eje neural. La quimioterapia adyuvante ha demostrado ser útil independientemente de la etapa de la enfermedad. Tanto el propio meduloblastoma como su tratamiento provocan secuelas a largo plazo como son trastornos endócrinos e intelectuales, especialmente cuando los niños son tratados a una edad temprana o cuando se presentan complicaciones en la cirugía [76].

Los efectos de las hormonas sexuales sobre el crecimiento de los meduloblastomas han sido muy poco estudiados, pero actualmente existen algunos reportes que han demostrado la presencia del RE. En las células precursoras de tumores neuroectodérmicos primitivos (TNEP), de las cuales se derivan los meduloblastomas y otros tipos de tumores, se expresan transitoriamente altos niveles de RE [80, 81]. Estudios en una línea celular derivada de TNEP (PSFK1) demostraron que estas células expresan variantes similares a las isoformas RE α y RE β y que el tratamiento con E2 a bajas concentraciones estimula rápidamente (15 minutos) la fosforilación y translocación nuclear de ERK1/2 [82]. El E2 también aumenta la migración de estas células a través de la transactivación de sus receptores nucleares mediada por la señalización de ERK. Sin embargo, el tratamiento con esta hormona no induce el crecimiento celular, lo anterior puede deberse a que estas células presentan una elevada estimulación de este evento producida por la señalización autócrina y parácrina de la vía de señalización de PDGF [82]. Estos resultados sugieren que las acciones de señalización rápida y la transactivación mediada por los RE participan en la invasividad de las células derivadas de TNEP.

Al igual que en células PFSK1, estudios en dos líneas celulares derivadas de meduloblastoma (Daoy y D283Med) demostraron la expresión de variantes del RE β . Por ensayos de inmunohistoquímica se ha encontrado que el RE β está altamente expresado en el 100% de biopsias de meduloblastomas primarios, mientras que RE α se expresa a bajos niveles en las células derivadas de meduloblastoma y solo el 41% de las biopsias estudiadas expresa este receptor [83]. Estudios con xenoinjertos también han confirmado que el E2 regula la invasión de células de meduloblastoma metastásico y el crecimiento del tumor *in vivo* y que agentes anti-estrogénicos como el ICI 162,780 bloquean eficazmente el crecimiento y la invasión del tumor [83, 84]. Estos estudios tanto *in vitro* como *in vivo* sugieren que los efectos de los estrógenos en el crecimiento e invasividad de los meduloblastomas podrían estar mediados por el RE. Contrario a esto, en

estudios realizados en un modelo *in vivo* de meduloblastoma generado en ratones mutados para el gen de un receptor de Sonic hedgehog, *Ptch1*, se encontró que el uso de un agonista específico del β RE (PPT) en estadios tempranos de la formación del tumor disminuye el desarrollo del meduloblastoma a través de vías antiproliferativas y pro-apoptóticas. En cambio, el agonista selectivo para α RE (PPT) no tuvo influencia alguna sobre la tumorigénesis [85]. Estos datos sugieren que en estadios tempranos del desarrollo de meduloblastomas, los estrógenos tiene un efecto protector contra el desarrollo del tumor mediado por el RE β . A pesar de que los datos muestran una relevancia en la participación del RE en el desarrollo tumoral, se requieren más investigaciones sobre las vías de señalización mediadas por estrógenos y sus receptores para explorar nuevos enfoques terapéuticos sin perder de vista el estadio del desarrollo del tumor.

Además de los efectos del E2 y su receptor en meduloblastomas no se han realizado estudios sobre la respuesta de estos tumores a tratamientos con P4 ni sobre la expresión de las isoformas del RP. Sin embargo, en una línea celular derivada de meduloblastoma humano (TE671) se encontró que el tratamiento con P4 disminuyó la transcripción del gen del Receptor para la Hormona Liberadora de Gonadotropinas tipo I (RHLG I) y el tratamiento con el antagonista del RP, el RU486, revirtió este efecto [86]. Estos resultados sugieren que la P4 regula la expresión del RHLG I a través de sus receptores. La acción de la P4 y la expresión de sus receptores en meduloblastoma aún requiere de una extensa investigación.

Conclusiones

Las hormonas sexuales como el E2 y la P4 juegan un papel importante en diferentes tipos de cáncer. En tumores primarios del SNC los efectos de estas hormonas (que en general inducen la proliferación celular) y la expresión de sus receptores son un factor a considerar a nivel clínico. Sin embargo, los efectos de las hormonas son muy variables dependiendo del modelo empleado para el estudio y del grado de evolución del tumor. Es por ello que se requieren realizar más investigaciones a nivel clínico y experimental, con el fin de determinar el papel que tiene cada hormona en los diferentes tipos de tumores cerebrales con el fin de desarrollar posibles terapias alternativas. Por ejemplo, la participación de los andrógenos en el desarrollo de los tumores del SNC no ha sido estudiada. Se ha reportado la expresión del RA en astrocitomas y meningiomas, pero no se han

realizado investigaciones con respecto a la importancia que pueda tener este receptor en el desarrollo de estos tumores [18, 19, 87].

Referencias

1. Ellmann, S., Sticht, H., Thiel, F., Beckmann, M. W., Strick, R., and Strissel, P. L. (2009) *Cell. Mol. Life Sci.* **66**, 2405–2426
2. Helsen, C., and Claessens, F. (2013) *Mol. Cell. Endocrinol.* **382**, 97–106
3. Schülke, J.-P., Wochnik, G. M., Lang-Rollin, I., Gassen, N. C., Knapp, R. T., Berning, B., Yassouridis, A., and Rein, T. (2010) *PLoS One* **5**, e11717
4. Hagan, C. R., Faivre, E. J., and Lange, C. A. (2009) *Steroids* **74**, 568–572
5. Hernández-Hernández, O. T., and Camacho-Arroyo, I. (2013) *Mini Rev. Med. Chem.* **13**, 635–642
6. Mani, S. (2008) *Endocrinology* **149**, 2750–2756
7. Lange, C. A., Shen, T., and Horwitz, K. B. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 1032–1037
8. Villamar-Cruz, O., Manjarrez-Marmolejo, J., Alvarado, R., and Camacho-Arroyo, I. (2006) *Brain Res. Bull.* **69**, 276–281
9. Sakamoto, H., Takahashi, H., Matsuda, K.-I., Nishi, M., Takanami, K., Ogoshi, M., Sakamoto, T., and Kawata, M. (2012) *Front. Biosci. (Landmark Ed.)* **17**, 996–1019
10. Cowppli-Bony, A., Bouvier, G., Rué, M., Loiseau, H., Vital, A., Lebailly, P., Fabbro-Peray, P., and Baldi, I. (2011) *Cancer Causes Control* **22**, 697–714
11. Louis, D. N. (2006) *Annu. Rev. Pathol.* **1**, 97–117
12. Furnari, F. B., Fenton, T., Bachoo, R. M., Mukasa, A., Stommel, J. M., Stegh, A., Hahn, W. C., Ligon, K. L., Louis, D. N., Brennan, C., Chin, L., DePinho, R. A., and Cavenee, W. K. (2007) *Genes Dev.* **21**, 2683–2710
13. Ahmed, A. U., Auffinger, B., and Lesniak, M. S. (2013) *Expert Rev. Neurother.* **13**, 545–555
14. Schwartzbaum, J. A., Fisher, J. L., Aldape, K. D., and Wrensch, M. (2006) *Nat. Clin. Pract. Neurol.* **2**, 494–503
15. Ohgaki, H., and Kleihues, P. (2005) *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **64**, 479–489
16. Alcántara Llaguno, S., Chen, J., Kwon, C.-H., Jackson, E. L., Li, Y., Burns, D. K., Alvarez-Buylla, A., and Parada, L. F. (2009) *Cancer Cell* **15**, 45–56
17. Vishwakarma, S., Paspala, S., Bardia, A., Tiwari, S., and Khan, A. (2013) *Adv. Cancer Res. Treat.* **2013**, 1–18
18. Paoletti, P., Butti, G., Zibera, C., Scerrati, M., Gibelli, N., Roselli, R., Magrassi, L., Sica, G., Rossi, G., and Robustelli della Cuna, G. (1990) *J. Neurosurg.* **73**, 736–742
19. Arevalo, M.-A., Santos-Galindo, M., Bellini, M.-J., Azcoitia, I., and Garcia-Segura, L. M. (2010) *Biochim. Biophys. Acta* **1800**, 1106–1112

20. Barone, T. A., Gorski, J. W., Greenberg, S. J., and Plunkett, R. J. (2009) *J. Neurooncol.* **95**, 37–48
21. Lis, A., Ciesielski, M. J., Barone, T. A., Scott, B. E., Fenstermaker, R. A., and Plunkett, R. J. (2004) *Cancer Lett.* **213**, 57–65
22. Chamaon, K., Stojek, J., Kanakis, D., Braeuninger, S., Kirches, E., Krause, G., Mawrin, C., and Dietzmann, K. (2005) *J. Neurooncol.* **72**, 11–16
23. Petrovska, S., Dejanova, B., and Jurisic, V. (2012) *J. Physiol. Biochem.* **68**, 455–460
24. Yague, J. G., Lavaque, E., Carretero, J., Azcoitia, I., and Garcia-Segura, L. M. (2004) *Neurosci. Lett.* **368**, 279–284
25. Carroll, R. S., Zhang, J., Dashner, K., Sar, M., and Black, P. M. (1995) *Neurosurgery* **37**, 496–503
26. González-Agüero, G., Ondarza, R., Gamboa-Domínguez, A., Cerbón, M. A., and Camacho-Arroyo, I. (2001) *Brain Res. Bull.* **56**, 43–48
27. Batistatou, A., Stefanou, D., Goussia, A., Arkoumani, E., Papavassiliou, A. G., and Agnantis, N. J. (2004) *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **130**, 405–410
28. Leslie, K. K., Keefe, D., Powell, S., and Naftolin, F. (1994) *J. Soc. Gynecol. Investig.* **1**, 238–244
29. González-Arenas, A., Hansberg-Pastor, V., Hernández-Hernández, O. T., González-García, T. K., Henderson-Villalpando, J., Lemus-Hernández, D., Cruz-Barrios, A., Rivas-Suárez, M., and Camacho-Arroyo, I. (2012) *Biochim. Biophys. Acta* **1823**, 379–386
30. Kabat, G. C., Etgen, A. M., and Rohan, T. E. (2010) *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **19**, 2421–2427
31. Sareddy, G. R., Nair, B. C., Gonugunta, V. K., Zhang, Q., Brenner, A., Brann, D. W., Tekmal, R. R., and Vadlamudi, R. K. (2012) *Mol. Cancer Ther.* **11**, 1174–1182
32. Li, W., Winters, A., Poteet, E., Ryou, M.-G., Lin, S., Hao, S., Wu, Z., Yuan, F., Hatanpaa, K. J., Simpkins, J. W., and Yang, S.-H. (2013) *Brain Res.* **1503**, 97–107
33. Pallud, J., Mandonnet, E., Deroulers, C., Fontaine, D., Badoual, M., Capelle, L., Guillet-May, F., Page, P., Peruzzi, P., Jouanneau, E., Frenay, M., Cartalat-Carel, S., Duffau, H., and Taillandier, L. (2010) *Ann. Neurol.* **67**, 398–404
34. Scarrott, L. J., Raina, A., Madej, T., and Rajesh, U. (2012) *J. Obstet. Gynaecol.* **32**, 704–705
35. González-Agüero, G., Gutiérrez, A. A., González-Espinosa, D., Solano, J. D., Morales, R., González-Arenas, A., Cabrera-Muñoz, E., and Camacho-Arroyo, I. (2007) *Endocrine* **32**, 129–135
36. Hernández-Hernández, O. T., González-García, T. K., and Camacho-Arroyo, I. (2012) *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **132**, 127–134
37. Altinoz, M. A., Bilir, A., Ozar, E., Onar, F. D., and Sav, A. (2001) *Int. J. Dev. Neurosci.* **19**, 541–547
38. Pinski, J., Halmos, G., Shirahige, Y., Wittliff, J. L., and Schally, A. V. (1993) *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **77**, 1388–1392

39. Ramaswamy, R., Ashton, K., Lea, R., Roberts, P., Davis, C. H., Golash, A., and Dawson, T. (2012) *Br. J. Neurosurg.* **26**, 336–339
40. Llaguno-Munive, M., Medina, L. A., Jurado, R., Romero-Piña, M., and Garcia-Lopez, P. (2013) *Cancer Cell Int.* **13**, 29-36
41. Khalid, H., Shibata, S., Kishikawa, M., Yasunaga, A., Iseki, M., and Hiura, T. (1997) *Cancer* **80**, 2133–2140
42. Assimakopoulou, M., Sotiropoulou-Bonikou, G., Maraziotis, T., and Varakis, J. (1998) *Clin. Neuropathol.* **17**, 27–34
43. Inoue, T., Akahira, J.-I., Suzuki, T., Darnel, A. D., Kaneko, C., Takahashi, K., Hatori, M., Shirane, R., Kumabe, T., Kurokawa, Y., Satomi, S., and Sasano, H. (2002) *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **87**, 5325–5331
44. Cabrera-Muñoz, E., González-Arenas, A., Saqui-Salces, M., Camacho, J., Larrea, F., García-Becerra, R., and Camacho-Arroyo, I. (2009) *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **113**, 80–84
45. Hansberg-Pastor, V., González-Arenas, A., Peña-Ortiz, M. A., García-Gómez, E., Rodríguez-Dorantes, M., and Camacho-Arroyo, I. (2013) *Steroids* **78**, 500–507
46. Jacobsen, B. M., and Horwitz, K. B. (2012) *Mol. Cell. Endocrinol.* **357**, 18–29
47. Graham, J. D., Yager, M. L., Hill, H. D., Byth, K., O'Neill, G. M., and Clarke, C. L. (2005) *Mol. Endocrinol.* **19**, 2713–2735
48. Sankila, R., Kallio, M., Jääskeläinen, J., and Hakulinen, T. (1992) *Cancer* **70**, 1568–1576
49. Marosi, C., Hassler, M., Roessler, K., Reni, M., Sant, M., Mazza, E., and Vecht, C. (2008) *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **67**, 153–171
50. Korhonen, K., Auvinen, A., Lyytinen, H., Ylikorkala, O., and Pukkala, E. (2012) *Am. J. Epidemiol.* **175**, 309–314
51. Blitshteyn, S., Crook, J. E., and Jaeckle, K. a (2008) *J. Clin. Oncol.* **26**, 279–282
52. Chow, M. S., Mercier, P. a, Omahen, D. a, Wood, S. L., and Johnson, J.-A. M. (2013) *Obstet. Gynecol.* **121**, 475–478
53. Blankenstein, M. a, Verheijen, F. M., Jacobs, J. M., Donker, T. H., van Duijnhoven, M. W., and Thijssen, J. H. (2000) *Steroids* **65**, 795–800
54. Carroll, R. S., Zhang, J., and Black, P. M. (1999) *J. Neurooncol.* **42**, 109–116
55. Blankenstein, M. a, Koehorst, S. G., van der Kallen, C. J., Jacobs, H. M., van Spriël, a B., Donker, G. H., van't Verlaat, J. W., Blaauw, G., and Thijssen, J. H. (1995) *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **53**, 361–365
56. Fakhrou, A., Meshkini, A., and Shadravan, S. (2012) *Pak. J. Biol. Sci.* **15**, 530–535
57. Korhonen, K., Salminen, T., Raitanen, J., Auvinen, A., Isola, J., and Haapasalo, H. (2006) *J. Neurooncol.* **80**, 1–7
58. Leães, C. G. S., Meurer, R. T., Coutinho, L. B., Ferreira, N. P., Pereira-Lima, J. F. S., and da Costa Oliveira, M. (2010) *Neuropathology* **30**, 44–49
59. Grunberg, S. M., Weiss, M. H., Russell, C. A., Spitz, I. M., Ahmadi, J., Sadun, A., and Sitruk-Ware, R. (2006) *Cancer Invest.* **24**, 727–733

60. Spitz, I. M., Grunberg, S. M., Chabbert-Buffet, N., Lindenberg, T., Gelber, H., and Sitruk-Ware, R. (2005) *Fertil. Steril.* **84**, 1719–1726
61. Matsuda, Y., Kawamoto, K., Kiya, K., Kurisu, K., Sugiyama, K., and Uozumi, T. (1994) *J. Neurosurg.* **80**, 527–534
62. Blankenstein, M. a, van der Meulen-Dijk, C., and Thijssen, J. H. (1989) *J. Steroid Biochem.* **34**, 419–421
63. Black, P., Carroll, R., and Zhang, J. (1996) *Acta Neurochir. Suppl.* **65**, 50–53
64. Verhagen, A., Go, K. G., Visser, G. M., Blankenstein, M. A., and Vaalburg, W. (1995) *Br. J. Neurosurg.* **9**, 47–50
65. Wolfsberger, S., Doostkam, S., Boecher-Schwarz, H.-G., Roessler, K., van Trotsenburg, M., Hainfellner, J. a, and Knosp, E. (2004) *Neurosurg. Rev.* **27**, 238–245
66. Roser, F., Nakamura, M., Bellinzona, M., Rosahl, S. K., Ostertag, H., and Samii, M. (2004) *J. Clin. Pathol.* **57**, 1033–1037
67. Mukherjee, S., Ghosh, S. N., Chatterjee, U., and Chatterjee, S. (2011) *Neurol. India* **59**, 817–822
68. Baxter, D. S., Orrego, A., Rosenfeld, J. V, and Mathiesen, T. (2013) *J. Clin. Neurosci.*, 6–11
69. Claus, E. B., Park, P. J., Carroll, R., Chan, J., and Black, P. M. (2008) *Cancer Res.* **68**, 314–322
70. Wiemels, J., Wrensch, M., and Claus, E. B. (2010) *J. Neurooncol.* **99**, 307–314
71. Barresi, V., Alafaci, C., Caffo, M., Barresi, G., and Tuccari, G. (2012) *Pathol. Res. Pract.* **208**, 350–355
72. Verheijen, F. M., Sprong, M., Jacobs, H. M., Donker, G. H., Amelink, G. J., Thijssen, J. H., and Blankenstein, M. a (2001) *Eur. J. Cancer* **37**, 1488–1495
73. Carroll, R. S., Brown, M., Zhang, J., Dizenzo, J., Mora, J. F. De, and Black, P. M. (2000) *Clin. Cancer Res* **6**, 3570–3575
74. Wechsler-Reya, R., and Scott, M. P. (2001) *Annu. Rev. Neurosci.* **24**, 385–428
75. McKean-Cowdin, R., Razavi, P., Barrington-Trimis, J., Baldwin, R. T., Asgharzadeh, S., Cockburn, M., Tihan, T., and Preston-Martin, S. (2013) *J. Neurooncol.* **115**, 153–160
76. Gajjar, A., Packer, R. J., Foreman, N. K., Cohen, K., Haas-Kogan, D., and Merchant, T. E. (2013) *Pediatr. Blood Cancer* **60**, 1022–1026
77. Louis, D. N., Ohgaki, H., Wiestler, O. D., Cavenee, W. K., Burger, P. C., Jouvett, A., Scheithauer, B. W., and Kleihues, P. (2007) *Acta Neuropathol.* **114**, 97–109
78. Leary, S. E. S., and Olson, J. M. (2012) *Curr. Opin. Pediatr.* **24**, 33–39
79. Packer, R. J., Rood, B. R., and MacDonald, T. J. (2003) *Pediatr. Neurosurg.* **39**, 60–67
80. Jakab, R. L., Wong, J. K., and Belcher, S. M. (2001) *J. Comp. Neurol.* **430**, 396–409
81. Zsarnovszky, A., and Belcher, S. M. (2001) *Brain Res. Dev. Brain Res.* **129**, 39–46
82. Kirby, M., Zsarnovszky, A., and Belcher, S. M. (2004) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **319**, 753–758

83. Belcher, S. M., Ma, X., and Le, H. H. (2009) *Endocrinology* **150**, 1112–1121
84. Belcher, S. M. (2008) *Brain Res. Rev.* **57**, 481–492
85. Mancuso, M., Leonardi, S., Giardullo, P., Pasquali, E., Borra, F., Stefano, I. De, Prisco, M. G., Tanori, M., Scambia, G., Majo, V. Di, Pazzaglia, S., Saran, A., and Gallo, D. (2011) *Cancer Lett.* **308**, 197–202
86. An, B.-S., Choi, J.-H., Choi, K.-C., and Leung, P. C. K. (2005) *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **90**, 1106–1113
87. Carroll, R. S., Zhang, J., Dashner, K., Sar, M., Wilson, E. M., and Black, P. M. (1995) *J. Neurosurg.* **82**, 453–460

Semblanza del Dr. Ignacio Camacho Arroyo



Ignacio nació en el Estado de México en 1962. Es biólogo por la Facultad de Ciencias de la U.N.A.M. con Maestría y Doctorado en Investigación Biomédica Básica también por la U.N.A.M. De 1993 a 1995 ocupó la plaza de Investigador Asociado “C” en el Departamento de Biología de la Reproducción del Instituto Nacional de la Nutrición para después integrarse como Profesor de Carrera de la Facultad de Química de la U.N.A.M. Actualmente es Profesor de Carrera Titular “C” Definitivo de Tiempo Completo en dicha Facultad y es Miembro del Sistema Nacional de Investigadores en el nivel III.

Ha impartido cursos desde hace 27 años en la U.N.A.M. a nivel licenciatura y posgrado. Su área de investigación es la Neuroendocrinología y se ha enfocado al estudio de las funciones y los mecanismos de acción de las hormonas sexuales. Es autor de 115 publicaciones en revistas indizadas y sus trabajos han merecido más de 1,500 citas. Ha publicado además 7 capítulos de libros internacionales y 11 nacionales, así como 7 artículos de enseñanza y divulgación de la ciencia. Es editor de un libro a nivel internacional sobre endocrinología y otro nacional sobre hormonas esteroides y pertenece a 8 Sociedades Científicas.

Ha coordinado 27 proyectos de Servicio Social, ha dirigido 25 tesis de licenciatura, 8 de maestría y 9 de doctorado y ha formado varios grupos de

investigación. Ha realizado múltiples actividades de divulgación de la ciencia en diferentes medios de comunicación. Ha obtenido diversos reconocimientos, entre los que destacan: la Distinción Universidad Nacional para Jóvenes Académicos en el Área de Docencia en Ciencias Naturales por la U.N.A.M. en el 2002; el Premio “Alfonso Rivera” de la Sociedad Mexicana de Nutrición y Endocrinología otorgado por trayectoria en Investigación en Endocrinología para Jóvenes Investigadores en el 2004; la Cátedra “Dr. Carlos Beyer Flores” por la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa (2007-2008). Fue miembro de la terna para la Dirección de la Facultad de Química de la U.N.A.M. en el 2009 y en el 2011.