

00562



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

ESTUDIO DE LA EXPRESION DE LAS ISOFORMAS  
DEL RECEPTOR A PROGESTERONA EN  
ASTROCITOMAS Y CORDOMAS HUMANOS

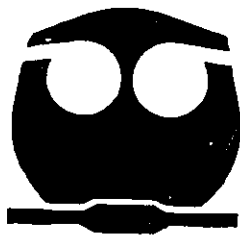
**T E S I S**

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

P R E S E N T A :

**BIOL. GABRIELA GONZALEZ AGÜERO**

DIRECTOR DE TESIS: DR. IGNACIO CAMACHO ARROYO



MEXICO, D.F.,

2000



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

*Esta tesis se realizó en el Departamento de Biología Molecular de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Ignacio Camacho Arroyo. Este trabajo fue apoyado por el CONACYT (2115-P).*

*Jurado Asignado.*

*PRESIDENTE*                      *Dr. Adolfo García Sainz*  
*VOCAL.*                              *Dr. Fernando López Casillas*  
*SECRETARIO.*                      *Dr. Rogelio Rodríguez Sotres.*  
*1er. SUPLENTE.*                      *Dra. Martha Menjívar Iraheta*  
*2do SUPLENTE.*                      *Dr Julio Morán Andrade.*

*ASESOR : Ignacio Camacho Arroyo.* \_\_\_\_\_

*SUSTENTANTE: Gabriela González Agüero* \_\_\_\_\_

*A Matilde Agüero Puga:  
Con todo mi cariño  
1941-2000.*

*\*Porque sin el dolor, no aprenderíamos a escuchar en el silencio, donde callar es adorar y donde Dios se revela en plenitud.*

*\*Porque en el sufrimiento, él te explica sin que tú aceptes, que sin él no eres nada y aprendes a decir – Haz de mi lo que tu quieras Señor.*

*\*Porque sin dolor, no comprenderíamos que la más simple oración y el sacrificio más insignificante por otro ser humano, puede reconquistar a una muchedumbre que camina sin Dios.*

*\*Porque sólo en el dolor ponemos atención de cuanto nos escucha.*

*\*Porque el sufrir te lleva a vivir de la fe y por lo tanto a vivir con esperanza.*

*\*Por que sin dolor, no tendríamos la oportunidad de pararnos frente a él y dejarse amar por él, ya que el amor es la única verdad que existe y basta.*

*\*Porque ante el dolor aprendemos a ser sencillos y humildes, porque su ley es sencilla.*

*\*Porque sin la enfermedad no apreciaríamos la vida y todo lo que en ella existe.*

*\*Porque al dolor hay que aceptarlo como parte de la vida, hay que dominarlo y transformarlo en algo bueno para uno mismo y los demás.*

*Porque sin la muerte, no llegaríamos a eliminar toda esclavitud humana, a despojarse totalmente de lo que hasta ayer se ha poseído (hermanos, hijos padres, etc.).*

*Porque sin muerte no aprenderíamos a ser fuertes y el aprender, es renunciar a si mismo y nacer en Cristo teniendo una vida verdadera.*

*Y porque todo esto y más que aprendí de ti.*

*Gracias Mاما.*

*A Jesus, a mi padre y a Karina  
porque siempre serán parte de  
mi vida.*

## AGRADECIMIENTOS

- ***Dr. Ignacio Camacho Arroyo:***

*Por permitirme trabajar en este proyecto, por todas sus enseñanzas tanto académicas como personales, que me han ayudado a crecer como persona.*

- ***Dr. Adolfo García S., Dr. Rogelio Rodríguez S, Dra. Martha Menjívar I., Dr. Fernando López C., Dr. Julio Morán A.:***

*Pór su tiempo e interes para revisar este trabajo de inverstigación, ya que sus comentarios y sugerencias siriveron para complementar y mejorar este trabajo.*

- ***A todos mis compañeros de laboratorio( Christian, Sara, Andrea, Aliessa, Angélica, Mauricio, Adriana, Isabel, Francis, Paola, Jose, Dr. Cerbón, Dra. Angelina y a todos los nuevos elementos del grupo):***

*Porque durante el tiempo que tengo de conocerlos he recibido algo de cada uno de ustedes (una sonrisa, una palabra, un consejo, etc..) que ha enriquecido mi vida tanto en lo personal como en lo académico.*

- ***Al CONACYT y a la DGEP:***

*Por el apoyo económico brindado para la realización de mis estudios de posgrado.*

## ABREVIATURAS

**AF<sub>(1,2,3)</sub>**: Factor de activación.  
**cDNA**: Ácido desoxiribonucleico complementario.  
**DBD**: Dominio de unión al ácido desoxiribonucleico.  
**DNA**: Ácido desoxiribonucleico.  
**dNTP**: Deoxinucleótidos trifosfato.  
**EGF**: Factor de crecimiento epidérmico.  
**FSH**: Hormona foliculo estimulante.  
**GABA<sub>A</sub>**: Ácido gama amino-butírico.  
**GAPDH**: Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa.  
**GnRH**: Hormona liberadora de gonadotropinas.  
**HBD**: Dominio de unión a la hormona.  
**Hsp**: Proteína de choque térmico.  
**LH**: Hormona luteinizante.  
**LH-RH**: Hormona liberadora de la hormona luteinizante.  
**p**: Brazo corto del cromosoma.  
**P<sub>4</sub>**: Progesterona.  
**PAS**: Ácido periódico de Shift.  
**q**: Brazo largo del cromosoma.  
**RE**: Receptor a estrógenos.  
**RE $\alpha$** : Isoforma alfa del receptor a estrógenos.  
**RFC**: Receptores de factores de crecimiento.  
**RNA**: Ácido ribonucleico.  
**RP**: Receptor a progesterona.  
**RP-A**: Isoforma A del receptor de progesterona.  
**RP-B**: Isoforma B del receptor de progesterona.  
**RT**: Transcripción reversa.  
**RTM-MLV**: Transcriptasa reversa del virus de leucemia murino Moloney.  
**RT-PCR**: Transcripción reversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa.  
**RU486**: 11b-(4-pefil,dimetil-amino)-17b-hidroxi-17-(prop-1-inil)-estra-4,9, dien-3-ona.  
**S-100**: Proteína ácida 100% soluble en sulfato de amonio.  
**SNC**: Sistema Nervioso Central.  
**TGF**: Factor de crecimiento transformante.  
**U87MG**: Línea celular de glioblastoma multiforme humano U87.  
**UV**: Ultravioleta.

### Medidas y Unidades

**cm**: centímetro.

**g**: gramo.

**Kb**: kilo bases.

**KDa**: Kilo daltons.

**M**: molar.

**mm**: milímetro.



**mM**: milimolar.  
**°C**: Grados Celsius.  
**Pb**: Pares de bases.  
**pH**: Potencial de hidrógeno.  
**µg**: Microgramo.  
**mg**: miligramo.  
**rpm** Revoluciones por minuto.

Soluciones.

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

**DEPC**: Dietilpirocarbonato.

**EDTA**: Etilendiaminotetra acetato.

**KCl**: Cloruro de potasio.

**MgCl<sub>2</sub>**: Cloruro de magnesio.

**MOPS**: Ácido3-[N-morfolino] propanesulfónico.

**PBS**: solución bufer de fosfatos.

**TBE**: Tris borato y etilendiaminotetra acetato.

**Tritón X-100**: t-Octylphenoxyethoxyethanol.

Bases

**a**: Adenina.

**c**: Citosina.

**g**: Guanina.

**t**: Timina.

# ÍNDICE

## Abreviaturas

<b>1. Resumen.</b>	1
<b>2. Introducción.</b>	2
<b>3. Antecedentes.</b>	3
3.1 Estructura y función de las hormonas esteroides.	3
3.1.1. Generalidades.	3
3.1.2. Progesterona.	4
3.2 Receptor a progesterona.	11
3.2.1 Generalidades.	11
3.2.2 Isoformas del receptor a progesterona.	15
3.3 Cáncer.	18
3.3.1. Generalidades.	18
3.3.2. Tumores cerebrales.	21
3.3.3. Receptor a progesterona y tumores cerebrales.	27
<b>4. Planteamiento del problema.</b>	31
<b>5. Hipótesis.</b>	32
<b>6. Objetivos.</b>	32
<b>7. Materiales y Métodos.</b>	33
7.1 Obtención de las muestras.	33
7.2 Análisis inmunohistoquímico de las isoformas del receptor a progesterona.	34
7.2.1. Cortes de las biopsias.	34
7.2.2. Incubación con anticuerpos específicos.	35
7.2.3. Deshidratación y montaje.	36
7.2.4 Evaluación de los datos obtenidos.	37
7.3 Análisis de la expresión del gen del receptor a progesterona.	38
7.3.1 Extracción del RNA total.	38
7.3.2 Cuantificación y electroforesis del RNA total.	39

7.3.3 Transcripción reversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR).	41
7.3.4 Electroforesis de los productos de RT-PCR.	43
7.3.5 Análisis densitométrico.	43
<b>8. Resultados.</b>	<b>45</b>
<b>9. Discusión.</b>	<b>57</b>
<b>10. Conclusiones.</b>	<b>62</b>
<b>11. Referencias.</b>	<b>63</b>
<b>12. Apéndice.</b>	<b>78</b>
<b>13. Artículo:</b> Camacho-Arroyo I, González-Agüero G, Gamboa-Domínguez A, Cerbón M.A, Ondarza R. Progesterone receptor expression pattern in human chordomas <i>J. Neuro Oncol.</i> 00: 1-7, 2000.	<b>83</b>

## 1. RESUMEN

La progesterona regula distintas funciones del Sistema Nervioso Central a través de la interacción con receptores intracelulares específicos (RP). Se han descrito hasta el momento dos isoformas del RP en humanos con diferente actividad transcripcional: RP-A (94 kDa) y RP-B (116 kDa). El RP se ha encontrado en diversos tumores cerebrales como astrocitomas, craneofaringiomas y meningiomas, sin embargo se desconoce el patrón de expresión de las isoformas de este receptor en los tumores cerebrales lo cual es fundamental para tratar de implementar una alternativa para su tratamiento basada en la terapia hormonal. En este trabajo se determinó la expresión de las isoformas del RP en astrocitomas y cordomas humanos a nivel de la proteína por medio de la técnica inmunohistoquímica y a nivel del gen con la técnica de transcripción reversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR).

En el estudio inmunohistoquímico se analizaron 19 biopsias (13 astrocitomas y 6 cordomas). Se mostró que existe una expresión diferencial de las isoformas del RP en los tumores cerebrales analizados, la isoforma B se expresó predominantemente en los astrocitomas grado III (66%), en los astrocitomas grado IV (87%) y en los cordomas (100%). En el estudio de la expresión de las isoformas por RT-PCR 18 muestras fueron analizadas (12 astrocitomas y 6 cordomas) debido a que la cantidad de tejido en una muestra era muy pequeña para realizar la extracción del RNA. 11 astrocitomas y 6 cordomas expresaron el gen del RP. Los resultados obtenidos por RT-PCR muestran que la expresión de la isoforma B fue más alta que la de A, lo cual sugiere que la isoforma RP-B es predominante tanto en los astrocitomas grados III y IV como en cordomas.

Estos resultados indican que tanto en astrocitomas como en cordomas RP-B se expresa en mayor proporción que RP-A, tanto a nivel del RNA mensajero, como a nivel de la proteína.

## 2. INTRODUCCIÓN

Existen numerosos tipos de tumores cerebrales que han sido tratados con diversos procedimientos que son muy agresivos o comprometen el funcionamiento cerebral. Una alternativa menos agresiva usada en el tratamiento del cáncer de mama es la terapia hormonal basada en el uso de antagonistas a hormonas esteroides como el estradiol y la progesterona que inhiben el crecimiento tumoral. La progesterona regula distintas funciones a través de la interacción con su receptor (RP). Se han descrito dos isoformas del RP en el humano: RP-A (94 kDa) y RP-B (116 kDa) ambas se sintetizan a partir del mismo gen pero se expresan y se regulan de manera tejido-específica y pueden ejercer diferentes funciones. La presencia del RP se ha mostrado por diversas técnicas en meningiomas, astrocitomas y craneofaringiomas. Sin embargo, se desconoce el patrón de expresión de las isoformas del RP en los tumores cerebrales por lo que el conocimiento de dicho patrón es fundamental para un abordaje hormonal de esta patología.

Es por ello que el objetivo de este trabajo fue determinar la expresión de las isoformas del RP en astrocitomas y cordomas a través del análisis tanto a nivel de la proteína como a nivel del RNA mensajero.

Los resultados de este trabajo muestran una expresión diferencial de las isoformas del RP en los tumores cerebrales tanto a nivel de la proteína como a nivel de RNA mensajero que podría estar relacionada con los mecanismos moleculares involucrados en el crecimiento de los mismos.

### 3. ANTECEDENTES.

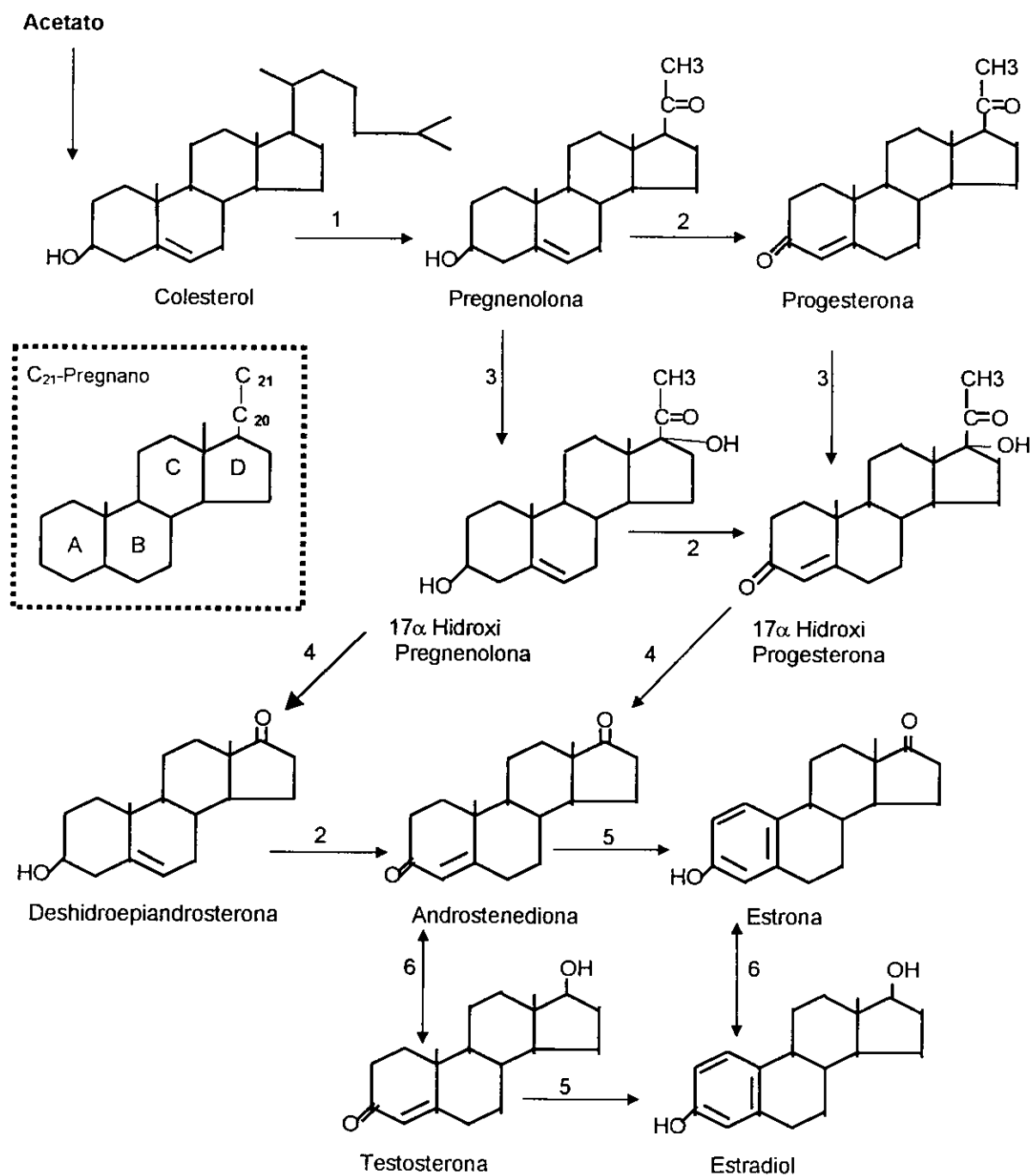
#### 3.1 Estructura y Función de las Hormonas Esteroides.

##### 3.1.1 Generalidades.

Las hormonas esteroides son lípidos no saponificables hidrofóbicos, solubles en disolventes orgánicos que estructuralmente presentan en común un núcleo químico básico, el ciclo-pentanoperhidrofenantreno (hidrocarburo cíclico constituido por diecisiete átomos de carbono dispuestos en tres anillos de seis átomos de carbono y un anillo de cinco átomos de carbono). El termino “esteroide” se deriva de la palabra griega *estéreos* = *sólido*; la mayoría de ellos se sintetizan en el ovario, el testículo y las glándulas adrenales utilizando al colesterol como precursor (Fig. 1).

Las hormonas esteroides desempeñan un papel muy importante en la regulación de múltiples procesos biológicos en los mamíferos, entre los que destacan la homeostasis hidrolítica, el dimorfismo sexual, la función reproductiva y la respuesta al estrés. Entre las hormonas esteroides se encuentran los estrógenos, la progesterona, los andrógenos, los glucocorticoides, etc.

Estas hormonas modifican la actividad celular al interactuar con receptores específicos, los cuales tienen una alta afinidad para cada hormona esteroide. Los receptores a hormonas esteroides son moléculas proteínicas; la mayoría se localizan en el núcleo de la célula y son parte de una familia de factores transcripción que regulan la expresión de genes específicos positiva o negativamente a través de la interacción con distintas secuencias en el DNA denominadas elementos de respuesta hormonal (Zhang et al., 1996).



**Fig.1. Síntesis de los principales esteroides.** 1) 20, 22 Desmolasa; 2) 3 $\beta$ -OH-esteroide deshidrogenasa. 3) 17 $\alpha$ -hidroxilasa, 4) 17, 20-esteroide liasa (desmolasa), 5) aromataasa, 6) 17 $\beta$ -OH-esteroide deshidrogenasa. En el recuadro se encuentra la estructura del pregnano al igual que de las letras con las que se denominan a cada uno de los anillos de la estructura principal de las hormonas esteroides (A, B, C, D) (Gore-Langton et al., 1988)

### 3.1.2 Progesterona.

La progesterona (4-pregnen-3,20-diona) pertenece al grupo de hormonas esteroides, su nombre se deriva del latín: *pro* = a favor y *gestare* = llevar, lo que denota el efecto de llevar o sostener el producto de la concepción (Pérez-Palacios, et. al, 1985). La estructura química de la progesterona ( $P_4$ ) y de sus metabolitos (derivados hidroxilados o reducidos) es la del hidrocarburo pregnano, constituido por 21 átomos de carbono (C-21; Fig.1). La  $P_4$  se sintetiza principalmente en el retículo endoplásmico liso en las células del cuerpo lúteo en el ovario durante el ciclo menstrual (Hsueh et al., 1984; Hutchison et al., 1986). Su síntesis está regulada por numerosas hormonas como la hormona luteinizante (LH), la hormona folículo estimulante (FSH), las prostaglandinas y los agentes  $\beta$ -adrenérgicos (Graham et al., 1997). Otros órganos donde también se ha demostrado la síntesis de  $P_4$  son la corteza suprarrenal, la placenta (Gorospe et al., 1985; Perrot-Appianat et al., 1982) y el testículo, que biosintetiza  $P_4$  como intermediario en la formación de otras hormonas esteroides (Weisz et al., 1980; Dalkin et al., 1992).

La síntesis de  $P_4$  se inicia con la conversión del colesterol a pregnenolona y posteriormente a progesterona (Fig. 2), mediada por distintas enzimas que se localizan en los tejidos u órganos anteriormente citados.

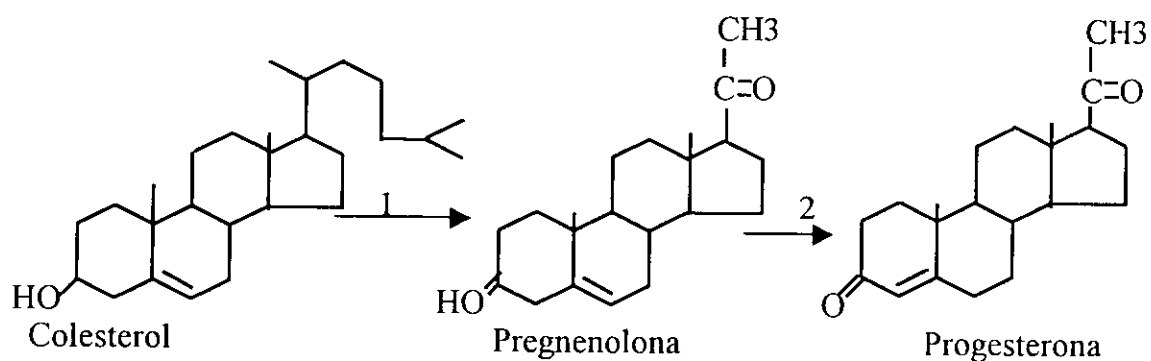


Fig. 2. Biosíntesis de la  $P_4$ . La biotransformación de colesterol a  $P_4$  implica tres cambios estructurales en la molécula: a) Pérdida de un fragmento de seis átomos de carbono de la cadena lateral en el C-17. b) la oxidación del grupo alcohol en el C-3. c) La migración del doble enlace del anillo B al anillo A. (1)= 20,22-esteroide liasa, (2)= 3 cetoesteroide  $\Delta^4\Delta^5$ -isomerasa (Pérez-Palacios et al., 1985).

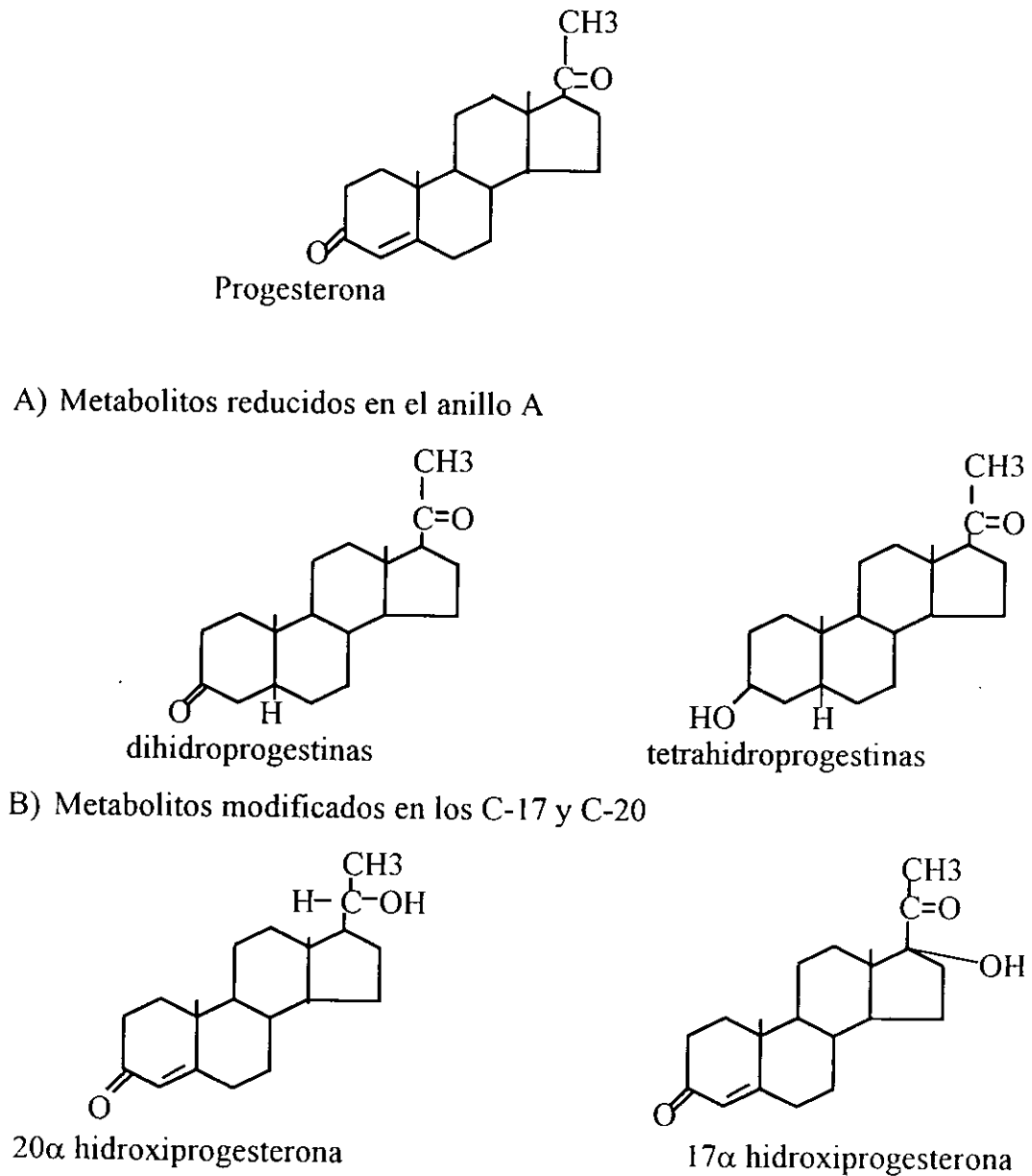


La P<sub>4</sub> puede reducirse para formar varios metabolitos (Fig. 3) los cuales pueden incrementar, prolongar o terminar los efectos de la P<sub>4</sub> o bien proporcionar mecanismos alternativos que modulen las acciones de la P<sub>4</sub> (Karavolas et al., 1990). Existen dos tipos de metabolitos: metabolitos reducidos en el anillo A: Dihidroprogestinas (5β, 5α-progestinas), las cuales tiene una gran potencia anestésica a nivel del sistema nervioso central y las tetrahidroprogestinas (reducción en los carbonos 5 y 3) que modulan el funcionamiento del aparato neuronal relacionado con la producción y liberación de la LH-RH. Existen otros metabolitos reducidos en el carbono 20 y en el carbono 17, la 20α hidroxiprogesterona y la 17α hidroxiprogesterona respectivamente, los cuales presentan numerosas actividades en el organismo. Estos se sintetizan en el ovario, hígado, riñón y placenta.

La P<sub>4</sub> participa en un amplio rango de actividades biológicas en numerosos tejidos (Tabla 1). Sus efectos pueden ser estimuladores como en la liberación de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH; Ke et al., 1987), de la dopamina (Dluzen et al., 1991) en la inducción de la lordosis (Schaeffer et al., 1990); en la síntesis de uteroglobina (Beier et al., 1968), en la reacción acrosomal y en el flujo de Ca<sup>2+</sup> en el espermatozoide (Meizel et al., 1991; Tesarik et al., 1992) y durante la diferenciación sexual; o bien, inhibidores como en la contractilidad uterina (Csapo et al., 1979) y la síntesis de norepinefrina inducida por AMPc en el hipotálamo (Petitti et al., 1992).

Los principales órganos blanco de la P<sub>4</sub> son: El útero, en donde regula su proliferación y diferenciación; el miometrio, en donde controla su contractilidad y mantiene las condiciones adecuadas para la implantación del embrión (Graham et al., 1997); en el ovario, en donde interviene en la maduración y liberación del ovocito maduro; en la glándula mamaria, en donde promueve la proliferación y diferenciación del tejido alveolar de la misma, además de la secreción de leche después del nacimiento (Graham et al., 1997). En el cerebro regula la excitabilidad neuronal, el sueño, la reproducción y la conducta sexual (Camacho-Arroyo et al., 1994, 1995 y 1999).

La P<sub>4</sub> participa también en la regulación de la temperatura corporal durante en el ciclo menstrual (Ganong et al., 1993).



**Fig.3. Principales metabolitos de la progesterona.** Metabolitos reducidos en el anillo A reducidos en el C5 y C3, dihidroprogestinas y tetrahidroderivados, respectivamente, y metabolitos reducidos en los C-17 y C-20 sintetizadas por la 17 $\alpha$ -esteroide hidroxilasa y la 20 $\alpha$ -esteroide deshidrogenasa, respectivamente.

Tabla 1. Acciones fisiológicas demostradas para la P<sub>4</sub>.

Tejido	Función
Utero/Ovario	Liberación del ovocito (1)
	Facilitación de la implantación (2)
	Mantenimiento del embarazo (3)
	Estimulación de la regeneración del estroma (4)
Glándula Mamaria	Desarrollo alveolar (5)
	Regulación de la síntesis de leche durante el embarazo. (6)
Cerebro	Regulación de la respuesta sexual (7).
	Excitabilidad neuronal, Sueño (8).
Pulmón	Incremento de la ventilación durante el ciclo menstrual y el embarazo (9).
Hueso	Regulación de la masa del hueso (10)

(1) Susuki et al., 1994; (2) Graham et al., 1997; (3) Rothchild et al., 1983; (4) Clarke et al., 1993; (5) Topper et al., 1980; (6) Savourete et al., 1990; (7) Camacho-Arroyo et al., 1995; (8) Camacho-Arroyo et al., 1999; (9) Brodeur et al., 1986; (10) Wei et al., 1993.

Se han determinado dos diferentes mecanismos de acción por los cuales la P<sub>4</sub> actúa dentro de la célula, estos son conocidos como mecanismos genómicos y no genómicos. El mecanismo genómico involucra la unión con su receptor intracelular específico (RP) para regular la transcripción de genes específicos. El mecanismo no genómico involucra la acción de la P<sub>4</sub> sobre bicapas fosfolipídicas, sistemas de segundos mensajeros, interacción con receptores membranales específicos e interacción con receptores a neurotransmisores como el GABA<sub>A</sub> (Mahesh et al., 1996; Fig. 4).

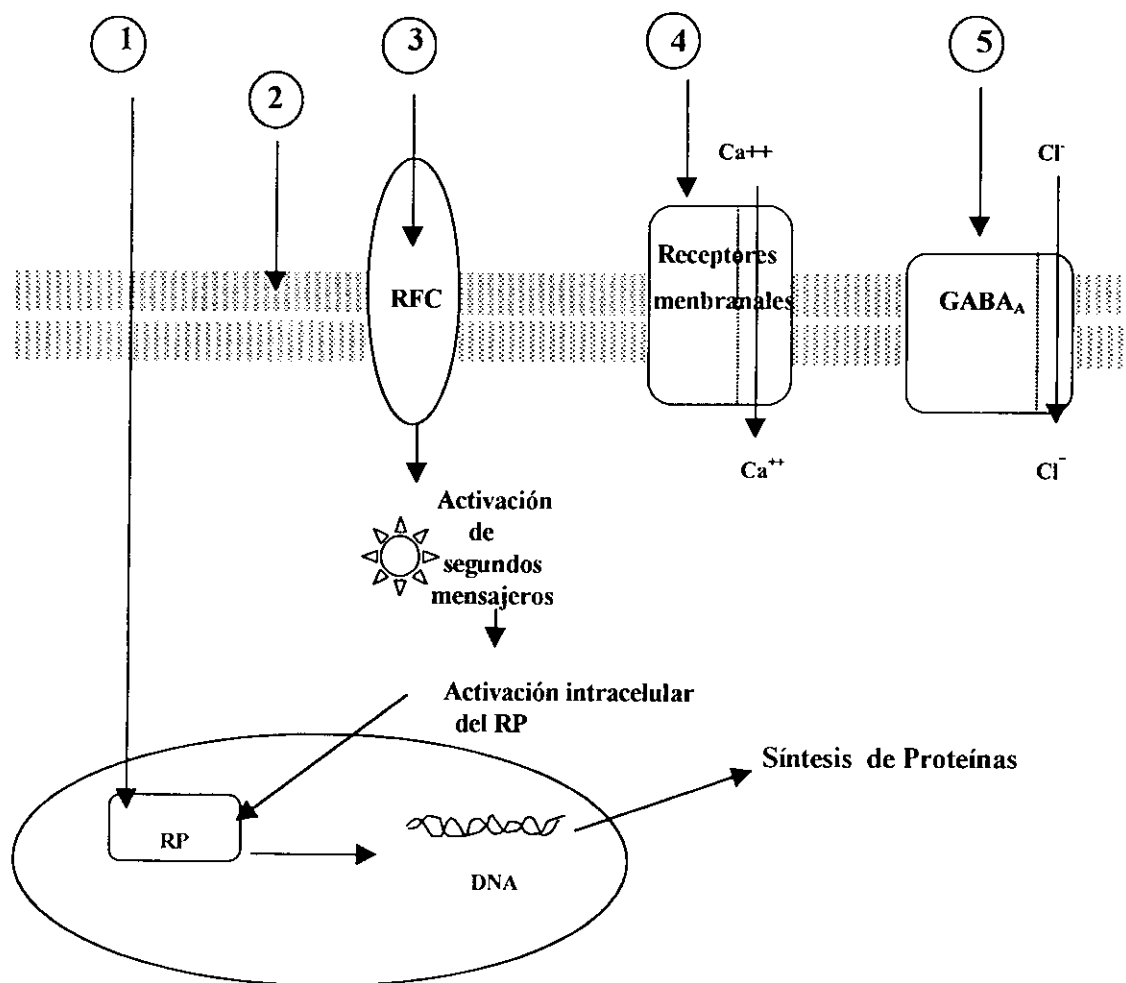


Fig 4. Mecanismos genómicos y no genómicos de acción de la Progesterona 1) Unión con un receptor intracelular específico (RP) regulando así la transcripción de genes específicos. Mecanismos no genómicos: 2) La acción de la  $P_4$  sobre bicapas fosfolipídicas. 3) Sistemas de receptores acoplados a segundos mensajeros como el de dopamina y los receptores de factores de crecimiento (RFC). 4) Interacción con receptores membranales a  $P_4$ . 5) Interacción con receptores a neurotransmisores como el  $GABA_A$  (Mahesh et al., 1996).

Una vez que la P<sub>4</sub> y sus metabolitos han llevado a cabo su función en el organismo, su catabolismo ocurre en dos etapas secuenciales:

1. La reducción en el carbono 20 y del anillo A en los carbonos 5 y 3.
2. La formación de glucoronidos, donde se incrementa la polaridad de la molécula formando compuestos hidrofílicos que facilitan su excreción por vía urinaria.

El proceso de reducción de la P<sub>4</sub> ocurre inicialmente en el carbono 20 dando lugar a la formación de la 20 $\alpha$  y 20 $\beta$  dihidroprogesterona que tienen actividad biológica, posteriormente se reduce el anillo A en los Carbonos 5 y 3 lo cual resulta en la formación de ocho pregnanandiolos o pregnantrioles los cuales al reducirse a glucoronidos son excretados por la orina (Fig. 5).

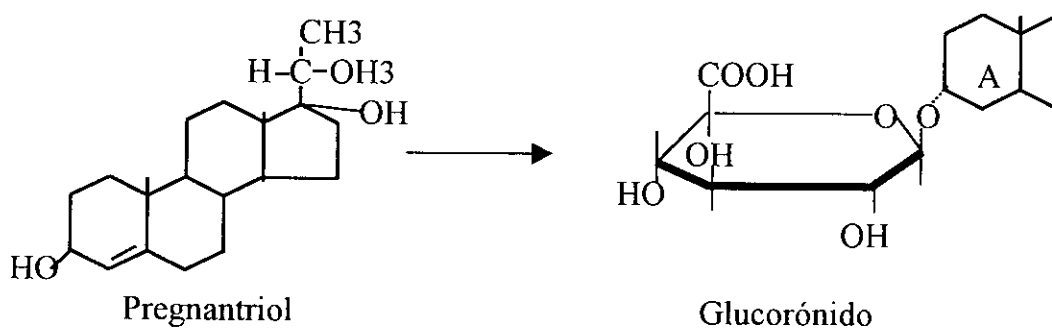


Fig. 5. Principales catabolitos de la Progesterona.

Otro de los efectos estudiados de la  $P_4$  es su participación en el ciclo celular y para ello se ha utilizado como modelo células de cultivo de cáncer de mama T47-D (las cuales son positivas para RP); Cuando se tratan estas células con  $P_4$  se observa un aumento en la progresión del ciclo celular, lo cual está relacionado con una inducción de genes asociados con la regulación del ciclo celular como las ciclinas (CD-1; Musgrove et al., 1991,1993), factores de crecimiento (EGF, TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ ; Murphy et al., 1986, Musgrove et al., 1993) y protooncogenes asociados con la actividad proliferativa (c-myc, c-fos; Wong et al.,1991; Musgrove et al., 1991). La inducción del ciclo celular por progestinas se ve reflejada en un aumento del número de células que entran a la fase S. Así también, se ha observado que esta inducción puede ser bloqueada con el antagonista del RP RU486 .

Las progestinas pueden inhibir también la expresión de genes involucrados en la supresión del crecimiento celular como el gen p53. Se ha observado que hay un decremento en la expresión de p53 producido por  $P_4$  en células T47-D (Hurd et al., 1995) sugiriendo que ésta puede estimular la proliferación celular por medio de la remoción de los efectos inhibidores de esta proteína.

## 3.2 Receptor a Progesterona.

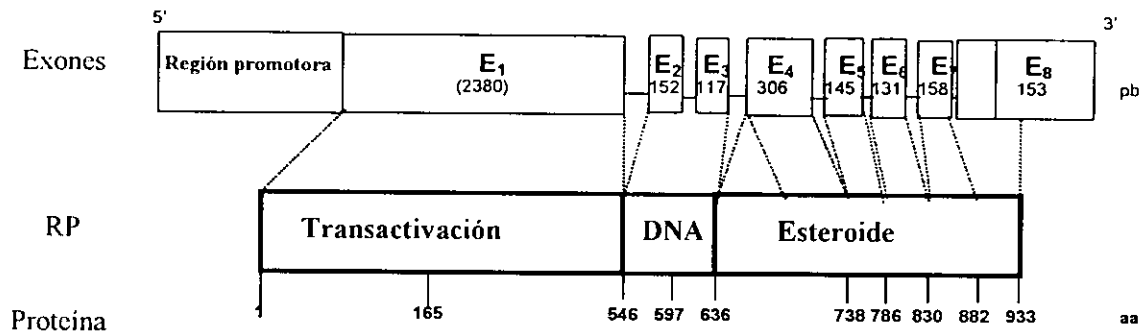
### 3.2.1 Generalidades.

La P<sub>4</sub> lleva a cabo sus efectos en la célula a través de la interacción con el receptor a progesterona (RP), el cual pertenece a la superfamilia de receptores a hormonas esteroides; cuyos miembros coordinan la morfogénesis y la homeostasis en respuesta a la unión con su ligando (Kastner et al., 1990). El RP es un factor de transcripción que regula la expresión de genes a través de la interacción con secuencias específicas en el DNA (elementos de respuesta hormonal).

El RP humano es codificado por un solo gen localizado en el cromosoma 11q22-23, el tamaño del cDNA es de aproximadamente 90 kb y comprende 8 exones y 7 intrones (Fig. 6; Savouret et al., 1990; Misrahi et al., 1993) y da lugar a un RNA mensajero de 3014 pb (Theveny et al., 1987).

Estructuralmente, el RP está compuesto por 5 dominios que llevan a cabo diferentes funciones:

- 1) **Dominio de transactivación (A/B):** Exon 1 (2380pb). Participa en la regulación de la transcripción de genes blanco.
- 2) **Dominio de unión al DNA (C):** Exones 2 (152 pb) y 3 (117 pb). Participa en la Dimerización con otro receptor y en la unión al DNA a través de la presencia de dedos de zinc.
- 3) **Dominio de unión a proteínas de choque térmico (Hsp90; D):** Exon 4 (306 pb) Participa en procesos de estabilización del receptor y en la translocación al núcleo.
- 4) **Dominio de unión al esteroide (E):** Exones: 5 (145), 6 (131),7 (158) 8 (153 pb) Interacción con el ligando y función de transactivación.



**Fig. 6. Estructura del gen del RP humano.** El gen del RP está constituido por una región promotora, una región terminal de transactivación, una región de unión al DNA y una región de unión a la hormona. Este gen constituido por 8 exones produce una proteína que pesa 120 kDa (Mirashi et al., 1993).

Se ha detectado la presencia del RP en diferentes tejidos del aparato reproductivo de distintas especies de vertebrados, (aves, roedores, conejos, perros, vacas, primates superiores); en células de la granulosa en el ovario (Milgrom et al., 1970; Fiel et al., 1972) en las trompas de falópio, vagina, testículo (Terner et al., 1977); en células de músculo de arterias uterinas (Perrot-Applanat et al., 1988); así como en el oviducto y bolsa de Fabricio de pollo (Ylikomi et al., 1985; González-Moran et al., 1998). El RP se ha localizado también en la glándula mamaria tanto tejido normal como neoplásico (Pollow et al., 1977; Horwitz et al., 1975) así como en distintas áreas del cerebro tales como el hipotálamo ventro medial, el área preóptica y la corteza cerebral (Warembourg et al., 1989; Camacho-Arroyo et al., 1998). También se encuentra en timo (Pearce et al., 1983), islotes pancreáticos (Green et al., 1978); en células osteoblásticas y pulmón (Camacho-Arroyo et al., 1996).

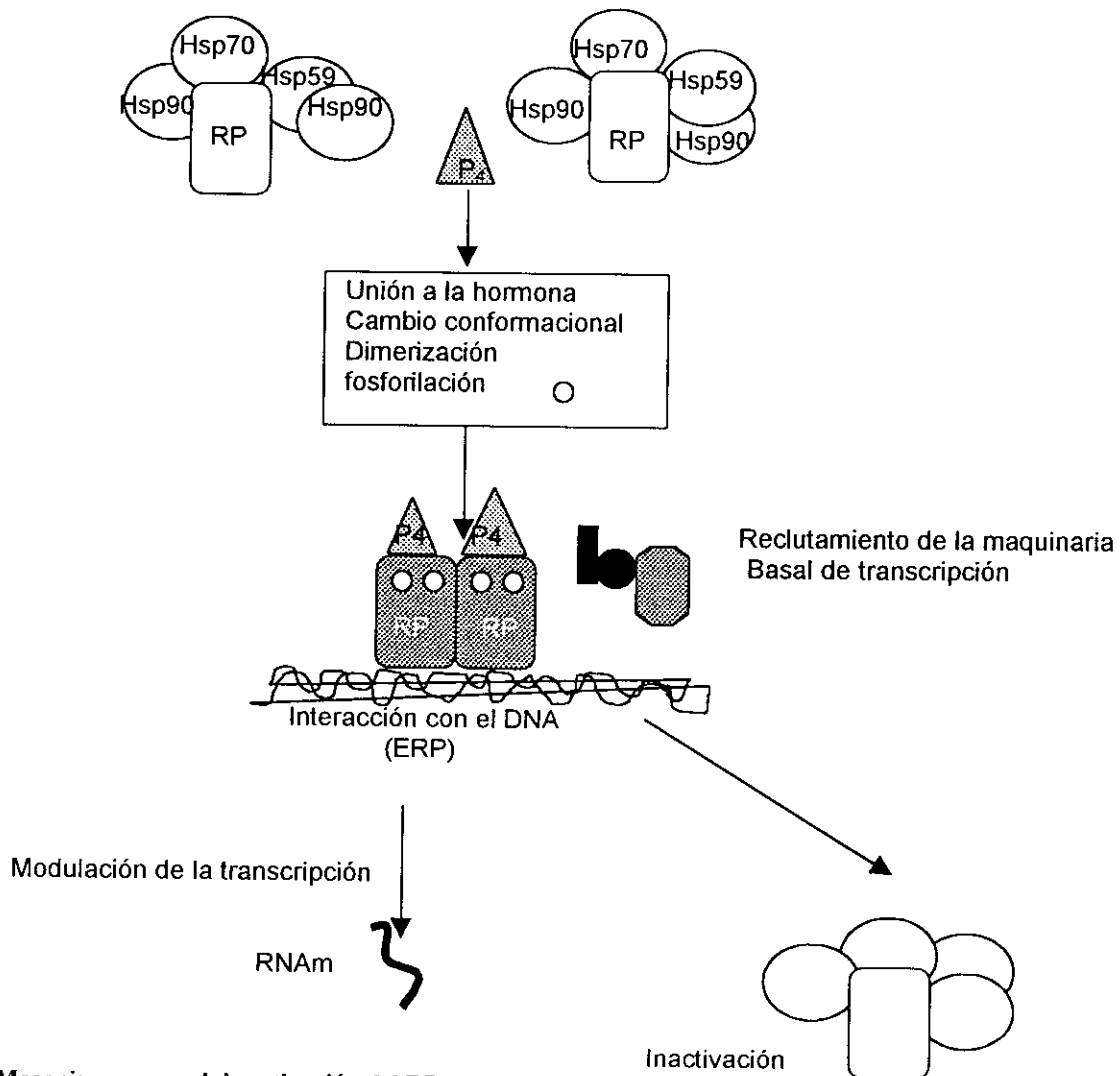
El mecanismo general de acción del RP activado por ligando es el siguiente:

En ausencia del ligando específico, el RP se encuentra transcripcionalmente inactivo formando complejos oligoméricos con proteínas de choque térmico como las Hsp (70, 90, 59) (Beato, 1987; Chambraud et al., 1990; Schowalter et al., 1991). Cuando la hormona circulante entra por difusión a través de las membranas citoplásmica y nuclear (Litwack et al., 1992) se une al receptor causando los distintos cambios conformacionales que promueven la fosforilación de éste (en residuos de



dependiente de ciclina A) y la disociación de las Hsp (Allan et al., 1992; Mirashi et al., 1987; Passinen et al., 1999; Clemm et al., 2000).

El receptor fosforilado presenta una alta afinidad por sitios en el DNA denominados elementos de respuesta, la formación de esta unión permite reclutar factores de transcripción hacia la región promotora para iniciar y regular la síntesis del RNAm (Mahesh et al., 1996; Beato et al., 1989). Una vez que se ha llevado a cabo la transcripción del gen, el RP y la maquinaria transcripcional se desensamblan del gen blanco y el receptor regresa a la fase de inactivación (Rodríguez et al., 1990; Fig. 7).



**Fig.7 Mecanismo general de activación del RP por su ligando.** La  $P_4$ , entra al núcleo y se une a su receptor. Esta unión produce un cambio conformacional en el receptor que aumenta su afinidad al DNA y así el complejo ligando-receptor interactúa con secuencias específicas llamadas elementos de respuesta hormonal lo cual modifica la transcripción del gen blanco (Giangrande et al., 1997).

El RP es regulado transcripcionalmente a la alta por estrógenos y a la baja por  $P_4$  en muchos tejidos blanco, como el útero (Graham et al., 1997; Mendoza-Rodríguez et al., 1999).

En otros estudios se demostró mediante la técnica de transcripción reversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), que la expresión del gen del RP es regulado por hormonas sexuales esteroides en el hipotálamo y la corteza cerebral, al igual que en el útero en conejas adultas; presentando una regulación a la alta por estrógenos y a la baja por la misma  $P_4$  (Camacho-Arroyo et al., 1996).

### 3.2.2 Isoformas del RP.

En algunas especies de vertebrados (pollo, roedores y primates) se han identificado dos isoformas del RP las cuales se han denominado A (80,000-94,000 daltones) y B (108,000-120,000 daltones; Schrader et al., 1981; Horwitz et al., 1996). Ambas isoformas son codificadas por el mismo gen pero son reguladas por distintos promotores que son inducidos por estrógenos. En el ser humano (Kasnter et al., 1990; Fig.8) y en la rata (Kraus et al, 1993) las isoformas del RP son originadas por distintos mensajeros, mientras que en las aves se originan por un procesamiento alternativo de un mismo RNA mensajero (Connely et al., 1989). Estudios bioquímicos indican que ambas isoformas tienen la misma afinidad al elemento de respuesta en el DNA (Christensen et al., 1991). El RP tiene la capacidad de unirse al DNA como tres especies diméricas: AA, AB, BB. Se ha demostrado que la transcripción mediada por el RP no es igual cuando se forman homodímeros o heterodímeros e interactúan con agonistas o antagonistas (Tora et al., 1988;

Las isoformas pueden tener diferentes funciones dependiendo del tipo celular, del gen blanco y del promotor (Tung et al., 1993). En muchos sistemas celulares la isoforma RP-B actúa como un activador transcripcional de genes como el del virus tumoral mamario de ratón, el gen que codifica a la tirosina aminotransferasa y a la timidina cinasa, mientras que RP-A funciona como un fuerte represor de la actividad transcripcional mediada tanto por RP-B, como por otros receptores a hormonas esteroides (Vegeto et al., 1993; Tung et al., 1993; Sartorius et al., 1994, Clemm et al., 1995).

Se ha determinado que las diferencias en la actividad transcripcional de las isoformas del RP se deben a distintos factores:

- 1.- La diferencia más importante entre las isoformas es que la isoforma A carece de los primeros 165 aminoácidos presentes en la isoforma B (Graham et al., 1995).

2.- La presencia de tres regiones con funciones de activación (AF1, AF2 y AF3). Las dos primeras están presentes en ambas isoformas, mientras que AF3 solamente se encuentra en RP-B (Giagrande et al., 1999).

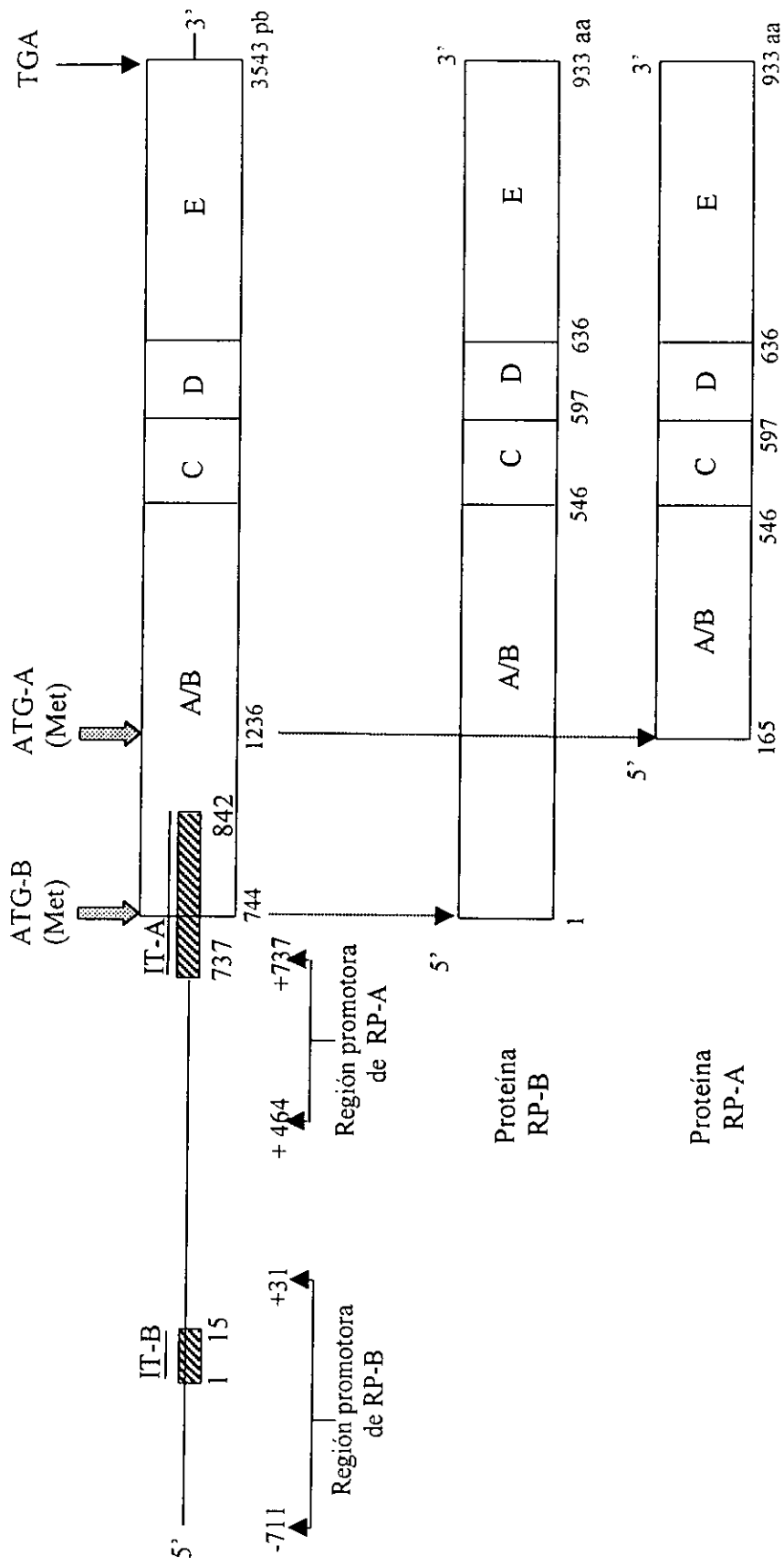
3.- La presencia de una región con función inhibidora localizada en la región adyacente a AF que sólo es funcional en RP-A. Estudios recientes han demostrado que esta región bloquea a AF1 y a AF2, pero no a AF3 presente en RP-B (Huse, 1998; Wen, 1994).

4.- Se ha observado que los dímeros formados por B:B tienen mayor capacidad de unirse a secuencias blanco del DNA (Schoonen et al., 1998), mientras que los heterodímeros son más inestables y presentan diferentes propiedades de unión al DNA.

5.- El RP humano es fosforilado al menos en siete residuos de serina, tres de estos sitios sólo se encuentran en el RP-B, mientras que los otros cuatro los comparten ambas isoformas (Takimoto et al., 1996; Bain et al., 2000; Zhang et al., 1998).

La diferente distribución y regulación de estos sitios de fosforilación en las isoformas del PR puede conferirles diferentes estados conformacionales, que los pueden hacer más o menos afines por las secuencias blanco y regular la transcripción de un gen de manera específica.

Estas observaciones sugieren que un desbalance en la expresión o actividades de ambas isoformas pueden tener importantes consecuencias en la capacidad de respuesta a la  $P_4$ . La tasa de expresión de las dos isoformas varía en diferentes órganos y tejidos blanco (Ing et al., 1993; Castren et al., 1990) sugiriendo que la expresión diferencial puede ser crítica para la respuesta celular apropiada a la  $P_4$  (Camacho-Arroyo et al., 1998). RP-A es predominante en el útero de roedores (50:1) así como en el sistema reproductivo de monos y humanos (2:1; Lessey et al, 1983).



**Fig.8. Organización de las isoformas del RP humano.** Los números indican la posición de las bases y de los aminoácidos en el gen y en las proteínas de las isoformas del RP respectivamente. IT-B e IT-A: Sitios de inicio de la transcripción de las isoformas RP-B y RP-A respectivamente; A-E: dominios funcionales del RP; ATG-B y ATG-A: Inicio de la traducción de RP-B y RP-A respectivamente; Met: Metionina; TGA: Sitio de término de la transcripción (Kastner et al., Fujimoto et al., 1997).

### 3.3 CÁNCER.

#### 3.3.1 Generalidades.

Una célula sana presenta una morfología definida, tiene la capacidad de dividirse, se comunica con las células que le rodean y responde a señales ambientales. El proceso de división y de crecimiento está determinado por el ciclo celular, que es el conjunto de diferentes fases (G1, S, G2, M) en donde una célula madre se divide produciendo dos células hijas con las mismas características y funciones potenciales. En este ciclo están involucradas señales estimuladoras e inhibitoras procedentes del exterior que regulan la división celular (Gautier et al., 1992). Las fases en las cuales está organizado el ciclo celular son:

**G1** Es la fase que se caracteriza por la síntesis de RNA y crecimiento celular.

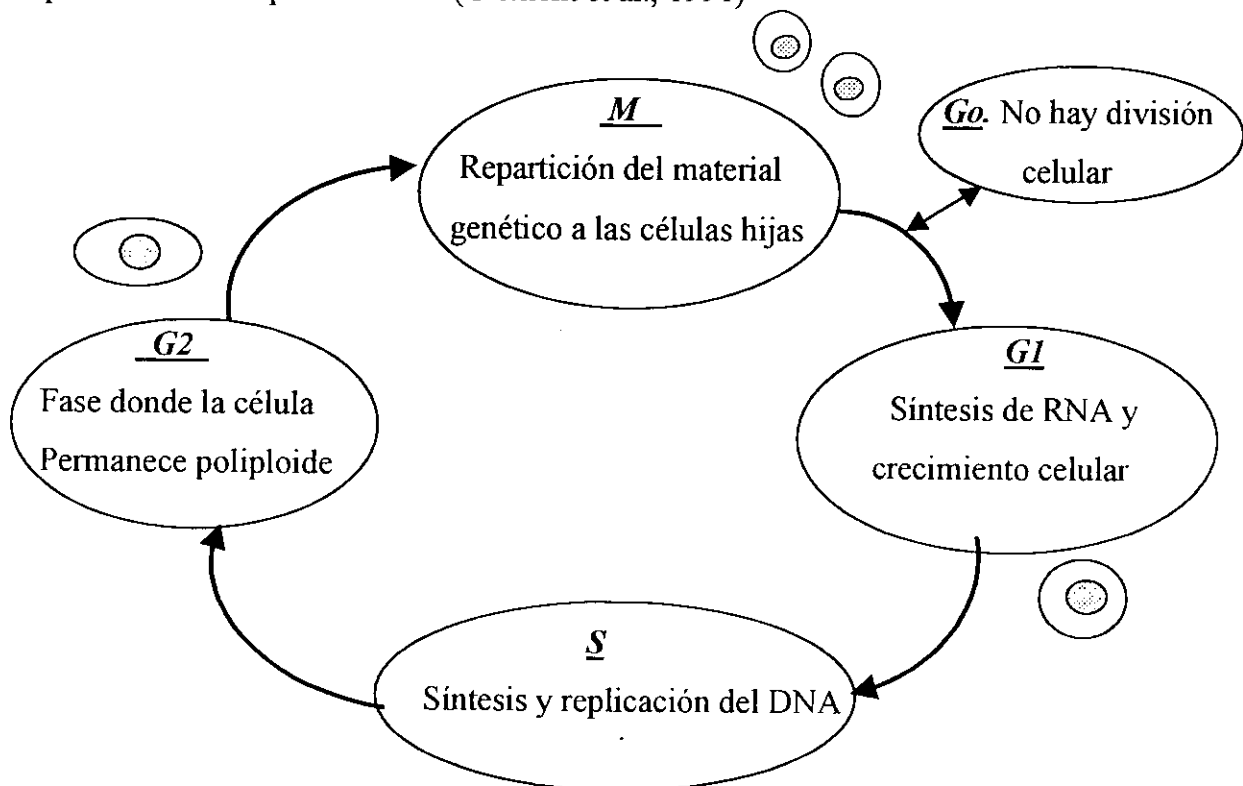
**S** Fase de síntesis y replicación del DNA.

**G2** Fase donde la célula permanece poliploide.

**M** Fase donde el material genético se reparte en las células hijas.

**Go** Período durante el cual la célula no se divide, pero cualquier estímulo apropiado puede iniciar la proliferación (Clement et al, 1991).

puede iniciar la proliferación (Clement et al., 1991)



El proceso de división celular está en constante riesgo de mutaciones y cambios que pueden alterar los mecanismos de regulación celular. Un conjunto de mutaciones en muchas ocasiones puede generar que una célula pierda capacidad de responder a estímulos que regulan el ciclo celular, lo cual se manifiesta a través de síntomas que provocan la duplicación sin control de la misma. La masa resultante daña los tejidos sanos de su alrededor, invade las barreras que separan unos órganos de otros y pueden establecer colonias en sitios cercanos o distantes. Toda esta patología corresponde a la enfermedad denominada cáncer. El proceso neoplásico está constituido esencialmente por una enorme proliferación celular anormal (tabla 2). En fases tempranas de su desarrollo es de forma exponencial, es decir, todas las células proliferan; por lo que la masa de estas células aumenta y se genera un desequilibrio en el aporte de nutrimentos y sangre con respecto a las células adyacentes.

**Tabla 2 Representación del tipo de crecimiento que presentan las células neoplásicas. El número de células neoplásicas y la masa aumentan con relación al número de duplicaciones de las células.**

Número de replicaciones	Número de Células	Masa
10	$10^2$	
20	$10^6$	1 mm
30	$10^9$	1 cm*
40	$10^{12}$	1 g**
50	$10^{17}$	10 g

(\*) tumor palpable por primera vez, (\*\*) 30 cm de diámetro.

Otra característica importante de las células tumorales es que éstas no forman sistemas tisulares ordenados ni órganos y su comportamiento patológico está relacionado también con alteraciones de estructura de la membrana celular. Dependiendo del estadio evolutivo de los tumores, se han clasificado como tumores benignos o malignos.

Un tumor de carácter benigno se caracteriza por presentar menor tendencia a invadir otros tejidos. Y aunque se dividen de manera incontrolada, la velocidad de división de las células es lenta; Sin embargo, pueden evolucionar en tumores malignos. En el caso de un tumor maligno las células presentan mayor agresividad, adquiriendo la propiedad de acelerar su división celular. Estos tumores son altamente invasivos de otros tejidos, donde continúan su crecimiento.

El cáncer es un padecimiento que ha motivado un gran número de investigaciones con la finalidad de encontrar nuevas terapias para su tratamiento ya que a pesar de los métodos empleados actualmente (como la quimioterapia, radioterapia etc.,) no se ha podido combatir esta enfermedad. Es por ello que es importante conocer los mecanismos que conducen al desarrollo de las células neoplásicas y encontrar así nuevas terapias menos agresivas y con mayor efectividad curativa.



### 3.3.2 Tumores Cerebrales.

Los tumores cerebrales son patologías numerosas y con múltiples características que producen síntomas neurológicos como consecuencia de su tamaño, localización y cualidades invasivas que destruyen los tejidos donde se localizan. Durante mucho tiempo se han propuesto numerosos factores y teorías para explicar el origen de estas neoplasias (factores causales, traumatismos, infecciones, enfermedades metabólicas, exposición a toxinas, etc.); Sin embargo, aún en la actualidad no se conoce de manera clara su origen. El estudio de los tumores cerebrales comenzó a finales del siglo pasado. Müller (1838) enunció por primera vez que los tumores cerebrales podrían originarse a partir de células embrionarias que permanecieron en el cerebro durante el desarrollo del individuo. Cohnleim (1878) sugirió que la causa de los tumores era una anomalía en la disposición embriológica de las células. Propone que los estímulos ambientales podrían generar neoplasias en lugares donde hay una rápida diferenciación de capas germinales o una migración de células embrionarias mal situadas. En 1879, Sir William Mckewen remueve por primera vez un tumor cerebral (De Vita 1995). Estos estudios permitieron que Cushing en 1926 clasificara y describiera más de 200 tumores cerebrales.

Más tarde, después de la segunda guerra mundial, se desarrollaron numerosas técnicas para la localización, extracción y terapias para los diversos tumores cerebrales (De Vita 1995). En la actualidad, se poseen grandes avances en la localización y tratamiento de los tumores cerebrales; a través de las Tomografías Computarizadas y de la Resonancia Magnética Nuclear se puede conocer con exactitud el tamaño, la forma y la profundidad del tumor. Con respecto al tratamiento de los tumores del SNC se conoce también que, además de la quimioterapia y la radioterapia, se puede tratar a los pacientes con terapia hormonal (como en los meningiomas); este tipo de tratamiento representa otra alternativa menos agresiva para los pacientes.

Las causas de los tumores cerebrales son variables. Entre éstas, se han identificado **Factores genéticos** que incluyen mutaciones tanto en el inicio del desarrollo del cerebro o como en la etapa adulta (Haber et al., 1994) así como **Factores ambientales** como agentes físicos (exposición a campos electromagnéticos), agentes químicos (como en la exposición a diversas sustancias como acrilonitrilo, formaldehído, aceites lubricantes, fenoles, solventes orgánicos, pesticidas); agentes biológicos como virus (Inskip, 1996).

Los tumores del Sistema Nervioso Central (SNC) constituyen del 10 al 15% del total de las neoplasias que más frecuentemente se presentan en el ser humano (Felix, 1995). De acuerdo con sus características histológicas se dividen en primarios o secundarios. Los tumores primarios corresponden a las neoplasias más comunes, constituyendo del 50% al 60% de las neoplasias intracraneales (Valenzuela et al., 1990). En México, los tumores primarios más frecuentes del SNC son los astrocitomas que representan el 60 %, el segundo lugar son los meningiomas con el 20%, los adenomas pituitarios el tercer lugar (18 %) y otros el 2% (Valenzuela et al., 1990). Los tumores cerebrales se clasifican de la siguiente manera:

Tumores de células neurogliales:	<i>(Astrocitomas, Oligodendrogliomas y Ependimomas).</i>
Tumores formados por neuronas:	<i>(Neurocitomas).</i>
Tumores meningoteliales:	<i>(Meningiomas).</i>
Tumores intracraneales de origen mesodérmico:	<i>(Fibrosarcomas, Condromas, Linfomas, Hemangioblastomas).</i>
Tumores de restos embrionarios y por defectos en el desarrollo:	<i>(Craneofaringiomas, Cordomas, Meduloblastomas).</i>
Tumores de la hipófisis:	<i>(Adenomas).</i>
Tumores de Plexos Coroideos:	<i>(Papilomas plexos corooides).</i>
Tumores de las raíces nerviosas:	<i>(Neurofibromas, Schwannomas).</i>

En general, los tumores cerebrales es que se presentan con mayor frecuencia en adultos entre los 30 y 50 años (Fig 9), y la mayoría se presentan indistintamente en hombres y en mujeres, sin embargo, se ha observado que los astrocitomas son más frecuentes en hombres y los meningiomas en mujeres (tabla 3).

**TIPOS TUMORALES**

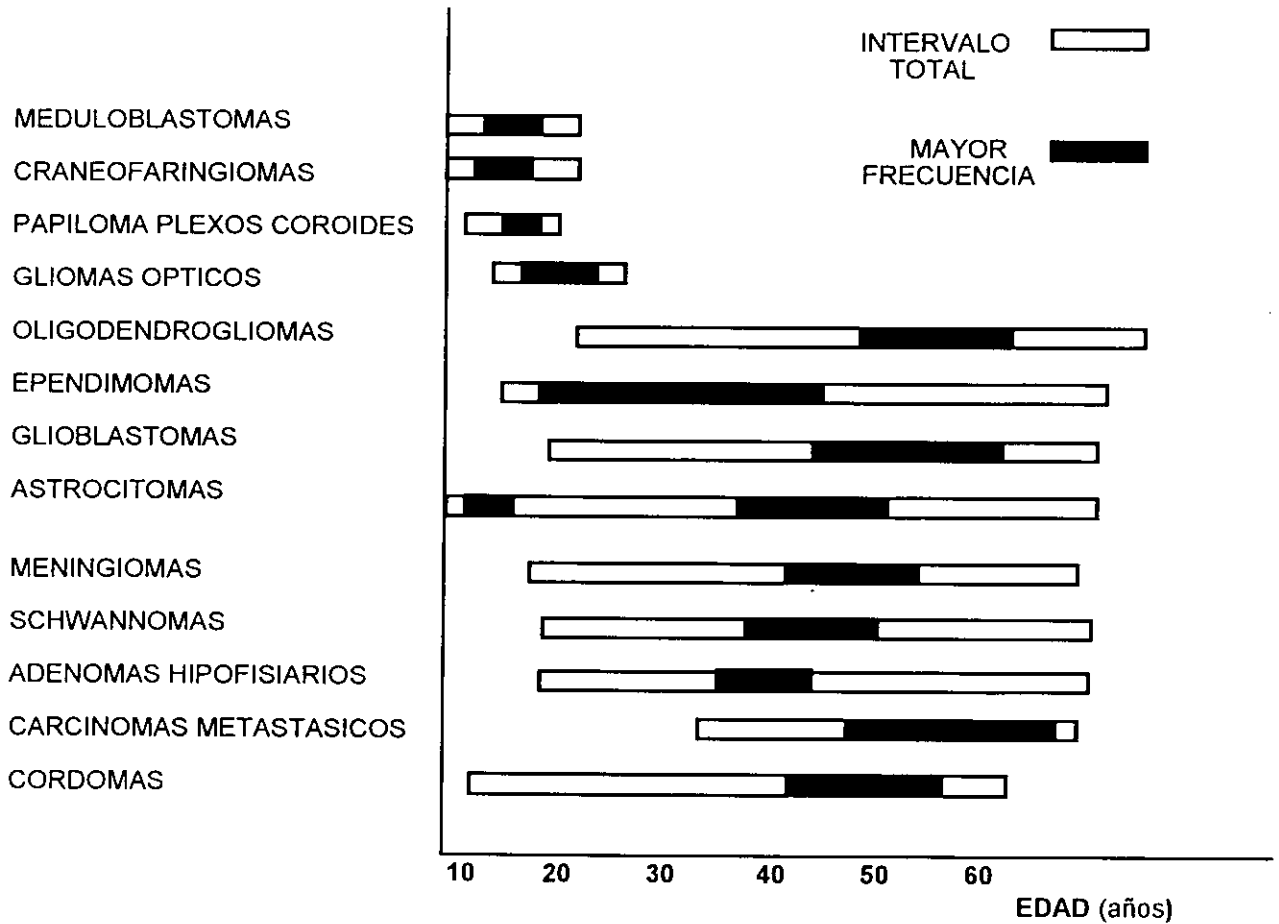


FIG.9 Edades más frecuentes donde se ha detectado la aparición de tumores cerebrales en el ser humano. (De Vita et al., 1995). □ Intervalo total de edad ■ Mayor frecuencia de aparición.

Tabla 3. Relación de aparición de tumores cerebrales entre Hombres (H) y Mujeres (M)

TIPO DE TUMOR	H/M	TIPO DE TUMOR	H/M	TIPO DE TUMOR	H/M
Meduloblastomas	5 : 2	Ependimomas	6 : 5	Craneofaringiomas	2 : 1
Oligodendrogliomas	9 : 7	Pinealomas	3 : 1	Epidermoides	5 : 2
Astrocitomas	3 : 2	Angioblastomas	2 : 1	Teratomas	7 : 4
Glioblastomas	2 : 1	Meningiomas	1 : 2	Angiomas	2 : 1
Cordomas	1 : 1				

Los tumores invaden y destruyen el tejido normal, muchos de sus efectos afectan funciones sensoriales, motoras y cognoscitivas, incrementan la presión intracraneal, forman edemas cerebrales y compresión de tejidos del cerebro, nervios craneales y vasos cerebrales.

El tratamiento de los tumores cerebrales depende de la patología y localización o la recurrencia del tumor. Así hay casos que pueden tratarse con un solo tipo de terapia o con terapias múltiples para reducir la masa del tumor, entre las que se incluyen la extracción del tumor por cirugía y la terapia de radiación.

## Tipos de tumores cerebrales

### *Astrocitomas*

Los astrocitomas se originan de los astrocitos, que son células gliales de forma estrellada y con grandes prolongaciones citoplásmicas, se encuentran junto a vasos sanguíneos, oligodendrocitos, neuronas y sus prolongaciones. Constituyen alrededor del 70% de todos los gliomas y el 45% de todos los tumores primarios del SNC en el mundo. Se localizan en cualquier parte del encéfalo especialmente en la corteza cerebral. Microscópicamente tienen una apariencia uniforme con alta actividad proliferativa de los astrocitos (Nguyen et al., 1984)

Mientras más malignos presentan mayor delimitación, en tanto que los benignos son difusos e infiltrantes, con tendencia a formar cavidades largas o pseudoquistes. Los astrocitomas, se clasifican en grado I y II cuando son benignos o de bajo grado de malignidad como los astrocitomas difuso, fibrilar, protoplasmático y pinocítico.

Los astrocitomas de grado III son multicelulares, presentan un notable pleomorfismo y anaplasia, con células multinucleadas y mitosis atípicas abundantes sin presentar extensas zonas de necrosis como en el grado IV. Son positivos a la prueba de la proteína fibrilar ácida glial. Los pacientes tienen una probabilidad de sobrevivencia del 50% aún con tratamiento de radioterapia. Los astrocitomas de grado IV comúnmente llamados gliomas, presentan una rápida evolución, son malignos y están localizados en los hemisferios cerebrales, ganglios basales y tálamo, principalmente. Estos últimos hasta de 5 cm, presentan áreas hemorrágicas con células redondas pequeñas, ovoides hasta agregados celulares grandes. Existe secreción de factores estimulantes de proliferación de vasos sanguíneos (factores angiogénicos) y presentan además células con grandes cantidades de filamentos, desprovistas de desmosomas y nucleolos prominentes. Las personas que desarrollan este grado de tumor tienen pocas esperanzas de vida.

Resultados de análisis de mapeo de cromosomas han demostrado que los astrocitomas presentan mutaciones frecuentes en los cromosomas 7q, 9p, 10p, 10q (Ransom et al., 1992).

### *Cordomas*

Son neoplasias malignas raras (3-4 %) originadas de restos o vestigios de la notocorda y tienen la capacidad de desarrollarse dentro de los huesos. La gran mayoría de los cordomas se originan en la región sacrococcígea y áreas esfenoide-occipital, presentándose en el clivus en un 40% de los casos y en el resto se distribuyen a lo largo de la columna vertebral (Heffelfinger et al., 1973), en donde invaden y destruyen el hueso (Mankin et al., 1985). Son neoplasias multilobulares de consistencia dura, con hemorragias focales de consistencia cartilaginosa y gelatinosa dispuestas en nidos, lóbulos o cordones de células rodeados por estroma de tejido conectivo con presencia de mitosis anormales y sin la presencia de pleomorfismo y anaplasias (Escourolle et al., 1971).

Histoquímicamente son positivos a la tinción de PAS e inmunohistoquímicamente a la proteína citoqueratina S-100 y al antígeno epitelial de membrana. Debido a su malignidad, este tipo de tumores puede ser recurrente con poca respuesta a la radioterapia y con esperanza de sobrevivencia de 5 a 8 años. El 50% de los cordomas puede ser metastásico a otros órganos como los pulmones, el hígado y la piel.

### 3.3.3 Receptor a progesterona y tumores cerebrales

Numerosos estudios han detectado la expresión de los distintos receptores a hormonas esteroides en tumores cerebrales. El RP ha sido detectado en astrocitomas (Khalid et al., 1997; Poisson et al., 1983; Brentani et al., 1984), craneofaringiomas (Honegger et al., 1997), meningiomas (Caroll et al., 1993; Bouillot et al., 1994), schwannomas y cordomas (Stojkovic et al., 1992), lo cual ha sugerido que uno de los factores que podrían estar involucrados en el crecimiento de estos tipos de tumores podría ser la P<sub>4</sub>.

En los meningiomas, la posibilidad de que su crecimiento este regulado por las hormonas sexuales se sugiere por observaciones epidemiológicas como:

- 1.-Mayor incidencia en mujeres que en hombres (Fig. 9; Kepes, 1982),
- 2.-Incremento en los síntomas durante la fase lútea, pero no durante la fase proliferativa del ciclo menstrual (Bozzetti et al., 1995; Halper et al., 1989)
- 3.-Crecimiento del tumor durante el embarazo pero disminución al término del mismo (Pliskow, 1995).
- 4.-Asociación entre la presencia de los meningiomas y el cáncer de mama (Halper et al., 1989; Grunberg et al., 1991).

Los primeros estudios reportados en los cuales se determinó la presencia de receptores a hormonas esteroides en meningiomas fueron realizados por Donell en 1979, quien detectó la presencia del receptor a estrógenos en cuatro de seis meningiomas, más tarde, Poisson en 1983 detectó la presencia del RP en 4 meningiomas. Posteriormente, el RP ha sido estudiado tanto *in vivo* como *in vitro*. Dentro de los estudios realizados más destacados se encuentran los de Markwalder (1983), Blankenstein (1983) e Ironside (1986), quienes demostraron la unión específica del receptor con la P<sub>4</sub> a través de ensayos de competencia. Blankenstein (1995), Brandis (1993) y Press (1988) demostraron la presencia del

RP por ensayo de competencia utilizando anticuerpos policlonales dirigidos contra el RP, observando una correlación directa entre la intensidad de la marca con los niveles del RP.

En años recientes, con la utilización de anticuerpos monoclonales y técnicas como la inmunohistoquímica, el análisis de Northern blot, la hibridación *in situ* y el RT-PCR se ha demostrado la presencia del RP, tanto a nivel de la proteína como a nivel de mensajero, en la mayoría de los tumores sólidos de meningiomas, así como en cultivos primarios de los mismos (Blaauw et al., 1995; Halper et al., 1989; Grumberg et al., 1987; Hayward et al., 1984; Michelsen et al., 1969; Speirs et al., 1997).

La asociación de los meningiomas con las hormonas esteroides brinda la posibilidad de la aplicación de una terapia hormonal como ocurre en el cáncer de mama donde la presencia tanto del receptor a estrógenos (RE) como del RP en los tumores representan un buen pronóstico para que los pacientes respondan favorablemente a una terapia hormonal a través de la utilización de agentes antiestrogénicos y antiprogestágenos.

Diversos estudios *in vitro* han sustentado el posible uso del antiprogestágeno mifepristona o RU486 (11b-(4-*pefil*,*dimetil-amino*)-17b-hidroxi-17-(*prop-1-inil*)-estra-4,9, dien-3-ona, compuesto con alta afinidad por el RP y el receptor a glucocorticoides) como tratamiento de los meningiomas: En 1987, usando cultivos primarios de meningiomas, Olson demostró una inhibición del crecimiento de las células en un 18% al 36% en los tres tumores analizados. El mismo grupo de investigación usando un modelo de ratones demostró la desaparición de los nódulos implantados en dos de tres ratones después de la administración de RU486.

Matsuda y colaboradores (1994) examinaron el efecto antitumoral de la RU486 y de otro agente antiprogestágeno llamado onapristona tanto *in vivo* como *in vitro*. En el caso de los estudios *in vitro* ambos antiprogestágenos tuvieron efectos citostáticos en 3 cultivos primarios de meningiomas obtenidos de



pacientes tratados con diferentes dosis de estos antiprogestágenos. En el caso de los estudios *in vivo* se implantaron células de meningioma en la cápsula subrenal de ratones hembra que fueron tratadas diariamente durante un mes con ambos antiprogestágenos obteniéndose una inhibición del 50% del crecimiento. Los estudios en paciente humanos tratados con antiprogestágenos son muy limitados y sus resultados son muy preliminares. Dentro de ellos destacan los realizados por Grunberg en 1991, quién trató a 14 pacientes con meningioma con RU486 vía oral (tabletas de 200 mg) a diferentes intervalos de tiempo entre 2 meses a 2 años y mediante tomografía computarizada o resonancia magnética nuclear observó una regresión del tumor por tomografía computarizada o resonancia magnética en un 35% de los individuos tratados con RU486, sin embargo, en tres casos obtuvo una progresión del tumor. Lamberts en 1992, demostró que el tratamiento de meningiomas progresivos con RU486, (200 mg por día durante 6 meses en 10 pacientes) produce una estabilización y una fuerte regresión de los tumores en seis casos.

Muchos estudios han encontrado una relación inversa entre la malignidad de los meningiomas y la presencia del RP. En muchos casos meningiomas malignos carecen de RP en comparación con los meningiomas benignos, los cuales presentan mayor expresión del RP (Brandis et al., 1993).

Otro punto a favor de la utilización de una terapia hormonal en estos tumores es la recurrencia, ya que, aunque este tipo de tumores son curables mediante cirugía, pueden recurrir en un 74% de los casos cuando no son extraídos en su totalidad (Rubistein et al., 1994; Carroll et al., 1993), lo cual obliga al uso de la radioterapia o de la quimioterapia.

Los astrocitomas representan el 45% de todos los tumores intracranianos, en ellos se ha demostrado que aproximadamente el 50% de los astrocitomas presentan RP en una proporción menor de expresión que con los meningiomas (Paoletti et al, 1990). Pero no se ha encontrado relación entre la edad, sexo o estado reproductivo de los pacientes. Se ha observado que existe una relación

entre el grado evolutivo de tumor con la expresión del RP. Así tumores de bajo grado evolutivo (astrocitomas grado I y II) presentan menor expresión de RP en comparación con tumores más agresivos (grados III y IV), en los que hay una mayor expresión (Caroll et al., 1993; Khalid et al, 1997, 1994; Magrassi et al., 1992), lo cual apoya la teoría de que en este tipo de tumores el RP participa en el crecimiento del mismo. Esta expresión es inversa a la que se observa en otros tumores típicamente regulados por hormonas esteroides como el cáncer de mama, neoplasias endometriales y meningiomas (Assimakopoulou et al., 1998).

En los astrocitomas sólo se tiene un estudio *in vitro* realizado por Pinski en 1993, en el que se trata a diferentes grupos de ratones macho inoculados con la línea celular de astrocitoma de alto grado de malignidad U87MG con la antiprogestina RU486 a diferentes concentraciones durante un mes. Los resultados del experimento indican que la administración de RU486 (0.5mg/día) provoca una reducción significativa en el volumen del tumor a una semana de tratamiento en comparación con el control.

En el caso de los craneofaringiomas cuyo pico de incidencia se presenta en la pubertad se ha sugerido que las hormonas esteroides regulan su desarrollo (Sorva et al., 1991). Honegger (1997) determinó la expresión del RP en 3 cultivos primarios de craneofaringiomas por RT-PCR, además de examinar el papel funcional que tiene la  $P_4$  sobre el crecimiento de los craneofaringiomas. Este autor sugiere que la presencia del mensajero del RP participa en la transducción de señales y así influye en eventos intracelulares. En este tipo de tumores, al contrario de los observado en otros, la  $P_4$  inhibe su crecimiento; sin embargo, el número de casos es pequeño, lo cual hace necesaria su comprobación con otros estudios con un mayor número de casos. Así, la  $P_4$  puede tener un papel importante en el desarrollo y control de las neoplasias en el cerebro. La manipulación hormonal de los tumores es considerada una importante estrategia terapéutica.

#### 4. Planteamiento del Problema.

El cáncer es la segunda causa de muerte en México. Los tumores cerebrales se encuentran entre las primeras 12 causas de muerte por cáncer. Los tumores cerebrales son una enfermedad que se ha tratado con diversos métodos como la radioterapia, quimioterapia y neurocirugía. Sin embargo, estas estrategias son muy agresivas y pueden comprometer el funcionamiento cerebral

La presencia del RP se ha mostrado por diversas técnicas en tumores cerebrales como en meningiomas, astrocitomas y craneofaringiomas. En el caso de los meningiomas, se ha demostrado una relación inversa entre la malignidad y la presencia del RP, tumores malignos carecen de RP mientras que los benignos expresan RP, esto crea la posibilidad de utilizar una terapia hormonal, en los casos en los que por la localización del tumor no se recomiende la neurocirugía.

La  $P_4$  regula distintas funciones a través del RP del cual se han descrito dos isoformas RP-A y RP-B que regulan distintos genes involucrados en la proliferación celular y su activación específica tiene distintos efectos incluso opuestos en el crecimiento de muchos tipos de cáncer dependiendo tanto del contexto celular como del tipo de isoforma que expresa el tumor.

Desafortunadamente, se desconoce cual es el patrón de expresión de las isoformas del RP en los distintos tipos de tumores cerebrales, lo cual es fundamental para el diseño adecuado de un tratamiento hormonal de los tumores cerebrales. Es por ello que en este trabajo se estudió la presencia de las isoformas del RP en astrocitomas y cordomas humanos, con la finalidad de establecer el patrón de expresión de las isoformas del RP, tanto a nivel de la proteína, como a nivel del gen; para así proporcionar información que sustente la implementación de una terapia de carácter hormonal en este tipo de tumores cerebrales.

## 5. HIPÓTESIS.

En los astrocitomas y en los cordomas humanos, las isoformas del RP presentarán un patrón de expresión diferencial relacionado con el tipo y la evolución del tumor.

## 6. OBJETIVOS.

### *General:*

-Conocer la expresión de las isoformas del RP en astrocitomas y cordomas humanos.

### *Particulares:*

-Determinar por inmunohistoquímica la presencia de las isoformas del RP en astrocitomas y cordomas en el ser humano.

-Evaluar la expresión de las isoformas del RP en astrocitomas y cordomas por RT-PCR.

- Relacionar los datos de expresión de las isoformas del RP a nivel de la proteína y a nivel del gen.

-Relacionar la expresión de las isoformas del RP en los astrocitomas con el grado de evolución tumoral.

## 5. HIPÓTESIS.

En los astrocitomas y en los cordomas humanos, las isoformas del RP presentarán un patrón de expresión diferencial relacionado con el tipo y la evolución del tumor.

## 6. OBJETIVOS.

### *General:*

-Conocer la expresión de las isoformas del RP en astrocitomas y cordomas humanos.

### *Particulares:*

-Determinar por inmunohistoquímica la presencia de las isoformas del RP en astrocitomas y cordomas en el ser humano.

-Evaluar la expresión de las isoformas del RP en astrocitomas y cordomas por RT-PCR.

- Relacionar los datos de expresión de las isoformas del RP a nivel de la proteína y a nivel del gen.

-Relacionar la expresión de las isoformas del RP en los astrocitomas con el grado de evolución tumoral.

## 7. MATERIALES Y MÉTODOS

### 7.1. Obtención de las muestras.

Las muestras tumorales se obtuvieron de pacientes sometidos a neurocirugía en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía de la Secretaría de Salud (I.N.N.N.), a los cuales se les practicó previamente un estudio de tomografía computarizada por medio de la cual se obtuvo la localización, la longitud y el volumen de cada tumor.

Una vez obtenidas las biopsias se dividieron en dos partes iguales, una para el análisis inmunohistoquímico y otra para el análisis por RT-PCR (Fig. 10). Las muestras se colocaron en criotubos NUNC de 1.8 ml e inmediatamente se sumergieron en nitrógeno líquido para su preservación hasta el momento de su análisis.

Las biopsias analizadas en este estudio fueron las siguientes:

Tipos tumorales	Número de muestras
Astrocitomas	
III	6
IV	7
Cordomas	6
Total	19

\*Los datos histopatológicos de los pacientes se encuentran registrados en el Apéndice.

## 7.2 Análisis inmunohistoquímico de las isoformas del receptor a progesterona.

### 7.2.1 Cortes de las biopsias.

Las biopsias se descongelaron y se fijaron en paraformaldehído al 4% durante toda la noche. Las muestras fueron deshidratadas en un aparato desecador (Autotechnica) donde las muestras se pasaron secuencialmente en formaldehído al 4%, etanol al 96%, etanol absoluto, etanol absoluto-xilol y terminando con xilol 2 veces, 2 min c/u. A continuación fueron colocadas en el aparato de inclusión Reichet HistoSTAT (paraplast, tissue-tek, VIP Processing enebbing Medium).

Se realizaron tres cortes del tejido a 6  $\mu\text{m}$  en un micrótomo y se colocaron en portaobjetos previamente tratados con Poly-L-lisina (ver apéndice). Se utilizaron 5 series de laminillas por tumor para determinar la presencia del RP, las 2 primeras para el RP-AB y RP-B sin contratinción, la tercera y cuarta para el RP-AB y RP-B contratñidas con hematoxilina de Harris y la última para el control negativo (sin anticuerpo primario).

Los cortes se desparafinaron en una estufa durante 1 h. a 60°C, y se hidrataron transfiriéndolos en xilol durante 10 min. posteriormente a xilol/alcohol (1:1) y en lavados sucesivos de alcohol etílico absoluto, al 96°, al 75°, al 50° y por último, agua destilada. Para la recuperación de los epítopes, las laminillas se colocaron en una solución de citrato de sodio (10 mM pH 6.0) y se calentaron 2 veces en el horno de microondas a 600 w durante ~ 45 seg agregando 1 min. más a partir del inicio de la ebullición, dejándolos entre cada calentamiento de 5 a 10 min. para enfriarse y reponer el citrato que se evaporó al calentarse. Las muestras se lavaron con bufer de fosfatos PBS 1X (50 mM, pH 7.4) 3 veces, durante 5 min.

### 7.2.2 Incubación con anticuerpos y revelado.

Para inactivar las peroxidasas endógenas, los cortes se incubaron en peróxido de hidrógeno al 3% en PBS, 30 min. Para facilitar la entrada de los anticuerpos las laminillas se incubaron con Tritón X-100 al 0.05% en PBS 30 min. y por último para bloquear proteínas inespecíficas se incubaron en una solución de suero normal de cerdo al 1% en PBS, 45 min. (entre las dos primeras incubaciones se realizaron dos lavados con PBS 5 min. en cámara húmeda a temperatura ambiente).

La incubación de las laminillas con el anticuerpo primario se realizó durante 24 h a 4°C en cámara húmeda de la siguiente forma:

- 2 laminillas con el anticuerpo monoclonal RP-AB \* (apéndice)
- 2 laminillas con el anticuerpo monoclonal RP-B
- 1 laminilla con suero normal de ratón 1:2000 (control negativo)

Los anticuerpos se prepararon en una solución de gelatina al 1%, tritón X-100 0.3% en PBS, la concentración final los anticuerpos fue de 4 µg/ml.

Para revelar la reacción antígeno-anticuerpo se utilizó el Kit de revelado Universal Dako Lsab+peroxidasa para ello, los tejidos se incubaron consecutivamente con el anticuerpo secundario biotinilado y con el complejo Streptoavidina-Peroxidasa que une al segundo anticuerpo y a su vez presenta sitios libres que al interaccionar con las moléculas de un cromógeno durante 45 min. en la cámara húmeda (entre cada una de las incubaciones se realizó dos lavados con PBS 5 min. c/u). Por último se utilizó 3-3'-Diaminobencidina disuelta en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 1 % y PBS durante 12 min. en oscuridad.

Transcurrido el tiempo se eliminó el exceso de cromógeno y los cortes se lavaron durante 5 min. en agua destilada. Una serie de cortes se contratiñeron con hematoxilina durante 45 seg. y se lavaron en agua corriente y se sumergieron en carbonato de litio 1mM por unos segundos para la eliminación del exceso de



hematoxilina, posteriormente se lavaron con agua corriente y junto con la otra serie que no se contratiñó, se deshidrataron como se describe a continuación.

### 7.2.3. Deshidratación y Montaje.

Los tejidos se lavaron sucesivamente durante 2 min. en cada caso con alcohol etílico a diferentes concentraciones iniciando con dos lavados de alcohol etílico al 70%, al 85%, al 90%, Absoluto, etanol absoluto/Xilol (1:1), por último, se colocaron en Xilol absoluto durante ½ min. Las muestras se fijaron con resina de bálsamo de Canadá y se colocaron en una estufa a 60° C durante 1 h.

### 7.2.4.- Evaluación de los datos obtenidos.

Se observaron las laminillas en un microscopio fotónico a diferentes aumentos (200, 400, 1000X) con lo cual se determinó la localización, intensidad y distribución de la inmunoreactividad tomando en cuenta los siguientes parámetros:

Localización: Nuclear o citoplásmica.

Intensidad:

Inmunoreactividad	Designación
Ausencia	Negativo
Ligera	(+)
Moderada	(++)
Fuerte	(+++)

Se realizó un conteo al azar de diez campos por laminilla a 400X obteniendo así el promedio de células inmunoreactivas para ambas isoformas.

### 7.3 Análisis de la expresión del gen de las isoformas del receptor a progesterona.

#### 7.3.1 Extracción del RNA total.

Se extrajo el RNA total de 18 biopsias de las 19 (debido a que la cantidad de tejido en un caso no fue suficiente para la extracción) a través del método de guanidina-isotiocianato/fenol/ cloroformo usando el reactivo TRIzol (apendice) de la siguiente manera:

En tubos de vidrio nuevos y estériles se colocó el tejido y se le añadió el reactivo de TRIzol (1ml de TRIzol por cada 100 mg de tejido). La ruptura celular se realizó en un homogenizador de tejidos (Polytron) a 4°C. El homogenado se virtió en tubos eppendorf de 1.5 ml nuevos y estériles a los que se les agregaron 200 µl de cloroformo por 1 ml de homogenado, se agitaron con vortex por 30 seg y se centrifugaron 15 min. a 12000 rpm a 4°C. obteniendo tres fases: una inferior de color rojo compuesta por fenol:cloroformo, otra superior acuosa incolora donde se encuentra el RNA y una interfase donde, se encuentran el DNA y las proteínas. Se recuperó la fase incolora, se colocó en otro tubo eppendorf y se agregó un volumen equivalente de isopropanol manteniendose a 4°C durante toda la noche.

Posteriormente para precipitar el RNA las muestras se centrifugaron por 15 minutos a 12000 rpm a 4°C, se removió el sobrenadante y el precipitado se lavó con etanol al 75% y se centrifugó a 7500 rpm durante 8 minutos a 4°C.

Se removió el sobrenadante, se dejó evaporar el etanol por completo y la pastilla de RNA de cada muestra se resuspendió en un volumen de H<sub>2</sub>O+DEPC proporcional a la cantidad de pastilla obtenida. Una vez disuelta la pastilla las muestras se mantuvieron a -20°C hasta el momento de su análisis.

### 7.3.2 Cuantificación y electroforesis del RNA total.

La cuantificación del RNA de las muestras se realizó de la siguiente manera:

Se hicieron 2 diluciones 1:500 en H<sub>2</sub>O-DEPC y se leyó la absorbancia a las longitudes de onda de 260 y 280 nm en un espectrofotómetro (UV 160U, UV-visible recording spectrophotometer, Shimadzu). Posteriormente se determinó la concentración de RNA tomando en cuenta que 1 unidad de absorbancia a 260 nm = 40 µg/ml de RNA. También se determinó la pureza del RNA por medio de la relación de absorbancias obtenidas a 260 y 280 nm (260/280 nm). El valor de esta relación en el que se considera puro el RNA es entre 1.8 y 2.0. La integridad del RNA fue verificada por electroforesis en geles desnaturalizantes de agarosa al 1%:

1. La preparación del gel consistió en pesar la cantidad necesaria de agarosa y disolverla en un volumen de H<sub>2</sub>O-DEPC en un matraz Erlenmeyer. Se colocó en el horno de microondas y se irradió durante 3 min a 600 w. Posteriormente se agregó el formaldehído y el MOPS 1X (apéndice), se mezcló la solución y se vertió en el molde de la cámara de electroforesis con el peine de los carriles ya incluido y se solidificó a temperatura ambiente.

	Concentración final
Agarosa	1%
Formaldehido	6%
MOPS	1X
H <sub>2</sub> O+ DEPC	*

(\*) ver apéndice.

2. La preparación de las muestras para el corrimiento electroforético fue la siguiente :

El RNA de cada muestra se mezcló con la formamida, el formaldehído y el MOPS y se calentó a 75°C por 5 minutos, se colocó inmediatamente en hielo por 5 minutos y posteriormente se agregaron el amortiguador de carga (apéndice) y el bromuro de etidio.

	Concentración final
RNA	3 µg
Formaldehído	50 %
Formamida	6.5 %
MOPS	1 X
Amortiguador de carga	1 X
Bromuro de Etidio	2.5 µg

3. Se cargaron las muestras en el gel y se separaron a 60 voltios por 90 minutos. Se observaron las muestras en un transiluminador de luz ultravioleta par determinar la integridad del RNA.

### 7.3.3 Transcripción reversa acoplada la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR).

#### Transcripción Reversa.

Se realizó la técnica de transcripción reversa de las muestras donde el RNA se encontró íntegro. Cuatro microgramos de RNA fueron utilizados en la reacción para producir una sola cadena de cDNA en un volumen de reacción de 20  $\mu$ l que contenía:

	Concentración final
RNA Total	4 $\mu$ g
Buffer RT (5 X)	50 mM Tris-HCl pH 8.3 75 mM KCl 3 mM MgCl <sub>2</sub>
DTT (100 mM)	10 mM
dNTPs (10 mM)	0.5 mM de cada dNTP
RTM-MLV (200 U/ $\mu$ l)	400 unidades
Oligo dT	0.05 $\mu$ g

La reacción se incubó a 37°C por 60 min. cuando se concluyó, las muestras se congelaron a -20°C. El control negativo consistió de una muestra de agua en lugar del RNA.

#### Síntesis de Oligonucleótidos.

Para amplificar las isoformas del RP se diseñaron dos pares de oligonucleótidos tomando en cuenta la secuencia del cDNA para el RP de humano (Milgrom 1987). Un par de oligonucleótidos se diseñó para amplificar una región común para ambas isoformas del RP, correspondiente al dominio de unión a la hormona RP A+B con una secuencia: 5' -[GCT ACG AAG TCA AAC CCA GT]-3' (sentido) y 5' -[CAC CAT CCC TGC CAA TAT C]-3' (antisentido) amplificando el segmento entre +2677 y 2952+ de 273 pb . El otro par de oligonucleótidos se diseñó para amplificar una región única para la isoforma B del RP con una secuencia: 5' -[TGA CTG AGC TGA AGG CAA AG]-3' (sentido) y 5' -[CGA CAG CGA CTG CTG GTC]-3' (antisentido) amplificando el segmento entre +176 y + 418 de 242 pb.

También, se utilizaron un par de oligonucleótidos para amplificar el gen de la enzima Glicer aldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH; Tso, 1985), que se usó como un control de carga de RNA. La secuencia fue 5' -[CCT GCA CCA CCA ACT GC]-3' (sentido) y 5' -[CAA TGC CAG CCC CAG CA]-3' (antisentido) amplificando el segmento +517 a +969 de 453 pb.

Reacción de Amplificación de las isoformas al RP.

Se realizó la reacción de PCR con 6.6 µl de reacción de RT, para amplificar los fragmentos de las isoformas del RP y del gen de la GAPDH en un volumen de reacción 50 µl que contenía:

	Concentración final
Bufer de PCR	20 mM Tris-HCl pH 8.4 50 mM KCl
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	1 mM
dNTPs (10 mM)	0.2 mM
Oligo sentido	0.5 mM
Oligo antisentido	0.5 mM
Taq DNA polimerasa	2.5 unidades
Agua cbp	40 µl

Una muestra de cDNA de endometrio humano se utilizó como control positivo, la cual también sirvió para poder estandarizar las condiciones de amplificación de las isoformas del RP en humano. En los controles negativos se utilizó agua en lugar del producto de RT así como sin cDNA.

La amplificación de las isoformas del RP se realizó en un termociclador (Perkin Elmer GeneAmp PCR System) con una etapa inicial de desnaturalización a 94°C por 5 min. seguida por 30 ciclos 94°C por 1 min para desnaturalización, 60°C por 1 min

para la hibridización de los oligonucleótidos con el templado, 72° C por 1 min. para la extensión y, por último, una etapa final de extensión de 72°C por 5 min.

#### **7.3.4 Electroforesis de los productos de RT-PCR.**

Los productos de amplificación de las isoformas del RP se analizaron por medio de la electroforesis en geles de agarosa al 2% preparados con Tris borato EDTA (TBE al 0.5X, ver apéndice). La preparación del gel consistió en pesar la cantidad necesaria de agarosa y disolverla en 180 ml. de TBE 0.5X en un matraz Erlenmeyer calentándola en el horno de microondas durante 3 min a 600 W. Posteriormente, se agregaron de 2.5 ml de bromuro de etidio 10 mg/ml (0.2 µg/ml concentración final), se mezcló la solución, se vertió en el molde de la cámara de electroforesis y se dejó solidificar a temperatura ambiente.

Se cargaron en el gel 25 µl de los productos de amplificación de PCR de las muestras más amortiguador de carga para DNA 6X y se separaron a 60 voltios por 90 minutos en el amortiguador TBE 0.5X. El gel teñido con bromuro de etidio se observó en un transiluminador de luz ultravioleta donde se apreciaron las bandas esperadas de la amplificación de las isoformas del RP y se les tomó una fotografía con negativo (Polaroid Co. Cambridge, MA) para ser analizadas posteriormente por densitometría.

#### **7.3.5 Análisis densitométrico.**

La intensidad de las bandas de amplificación de las isoformas del RP y de GAPDH fueron cuantificadas usando el programa de computadora Collage, New York, USA. El nivel de expresión de las isoformas del RP fue normalizado con los datos obtenidos de GAPDH.

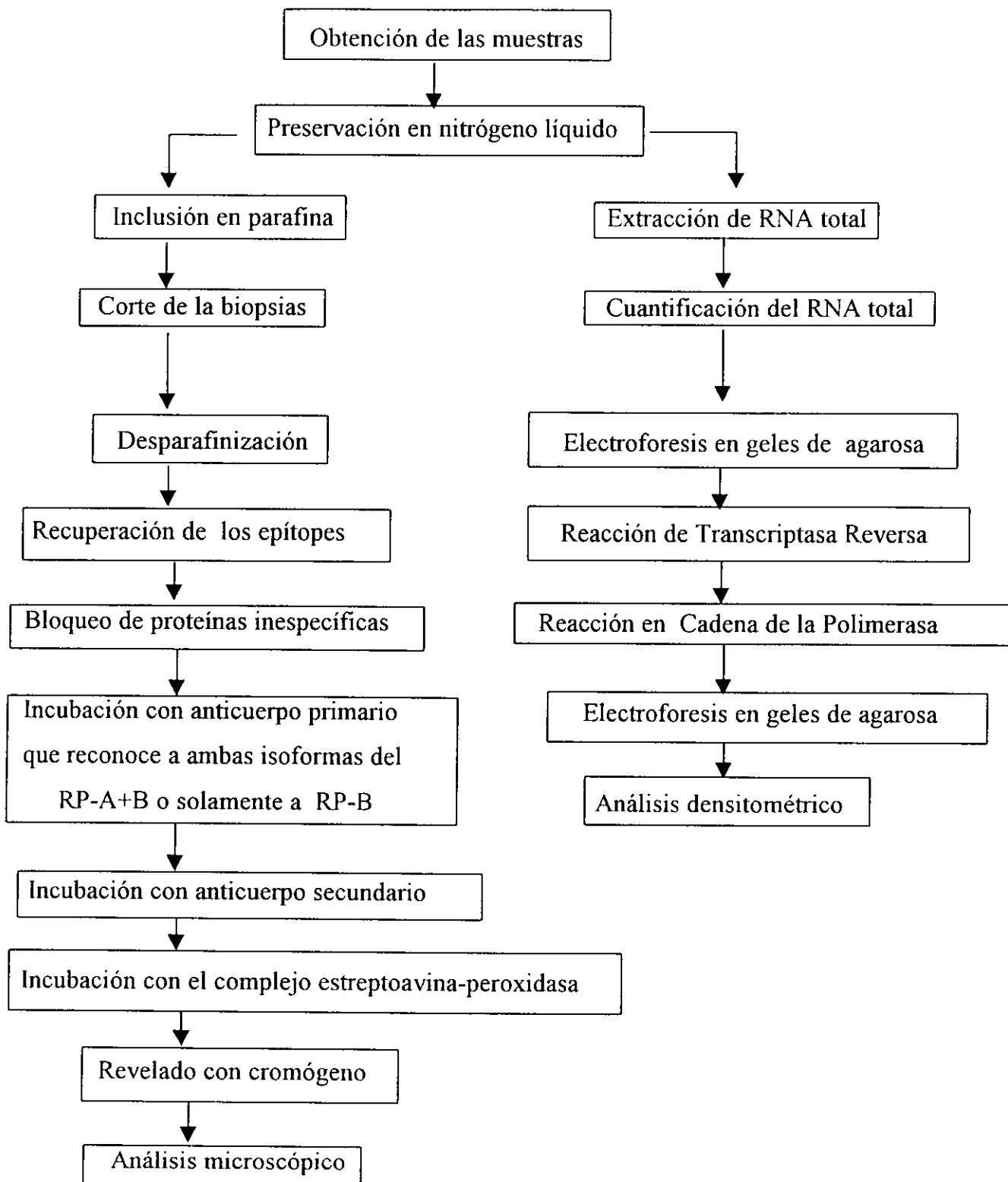


Fig. 10. Diagrama de flujo de los métodos inmunohistoquímico y de RT-PCR empleados en el estudio



## 8. RESULTADOS

En el presente trabajo se estudió la expresión de las isoformas del RP en 19 tumores cerebrales humanos de los cuales 13 fueron astrocitomas y 6 cordomas por medio de las técnicas de inmunohistoquímica y RT-PCR.

De los 13 astrocitomas analizados, 6 casos fueron de grado III y 7 de grado IV, en este tipo de tumores predominaron los casos de sexo masculino (8/13) con un rango de edad de 25-73 años y un promedio de 45 años y las 5 mujeres presentaron un rango de edad de 30-59 años con un promedio de 45 años de edad. Por último en los 6 cordomas que se analizaron predominaron los casos de sexo femenino (5/6) con un rango de edad de 17-56 años con un promedio de 37 años. El único hombre fue de 56 años de edad (Tablas 4 y 5).

### INMUNOHISTOQUÍMICA.

La inmunoreactividad a las isoformas del RP fue localizada en el núcleo tanto de las células de los astrocitomas como de los cordomas analizados, (Figs. 11 y 12) lo cual pudo ser comprobado al comparar cada ensayo positivo con su control negativo (incubado sin el anticuerpo primario) y observar la ausencia de tinción en los controles negativos (Figs. 11 y 12).

El 89.4% del total de los tumores analizados (17/19) mostró inmunopositividad a las isoformas del RP y el 10.5 % de los casos (2/19) fueron negativos para ambas isoformas. No se encontró relación entre la edad, sexo, localización del tumor y la expresión de las isoformas al RP. Con respecto a la distribución de las isoformas del RP, el 63.1% (12/19) de los casos expresó la isoforma B predominantemente y el 36.9% de los casos la isoforma A.

El número de células inmunoreactivas detectadas con el anticuerpo que sólo reconoce a la B fue muy similar al observado en las laminillas incubadas con el anticuerpo que reconoce a ambas isoformas (Tablas 4 y 5).

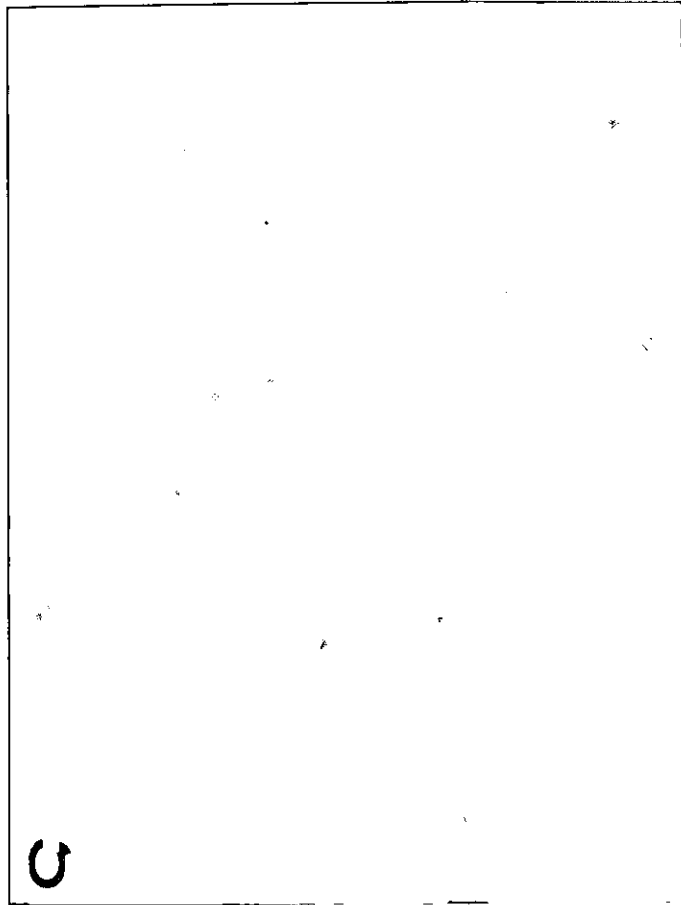
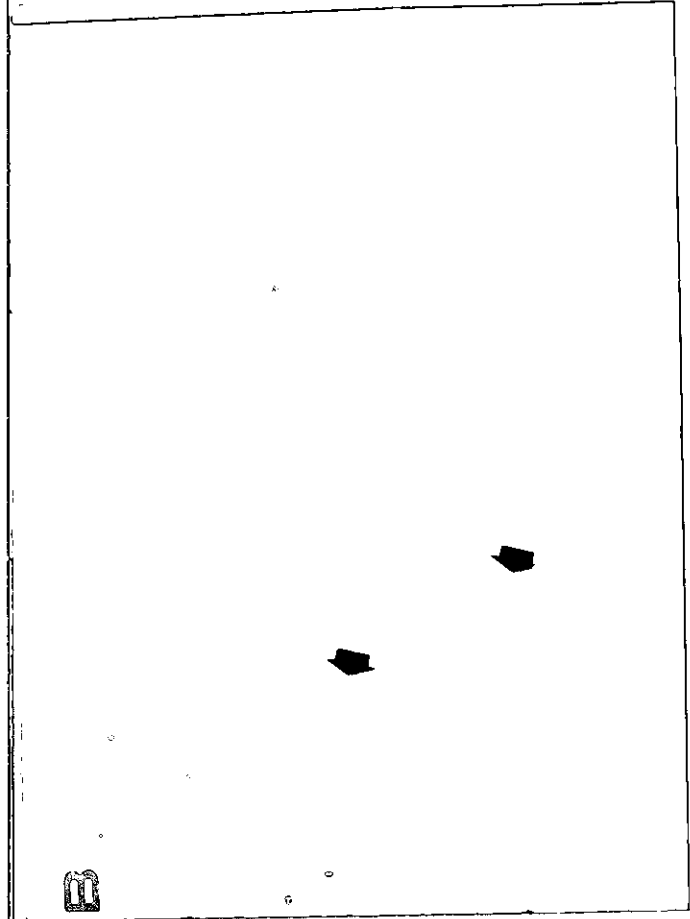
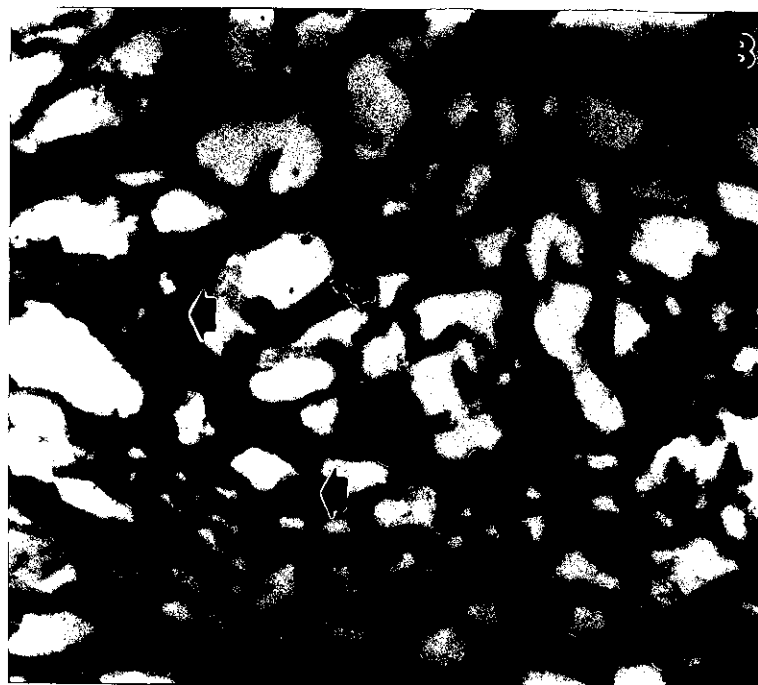


Fig.11. Análisis inmunohistoquímico de las isoformas del RP en un astrocitoma grado IV. Cortes de 6µm de una biopsia se incubaron con anticuerpos monoclonales que reconocen respectivamente: A) Ambas isoformas (RP A+B), B) Solamente al RP-B y C) control negativo, el cual fue incubado con suero normal de ratón. Las flechas indican algunos núcleos inmunoreactivos. (A-C): 400x.



D

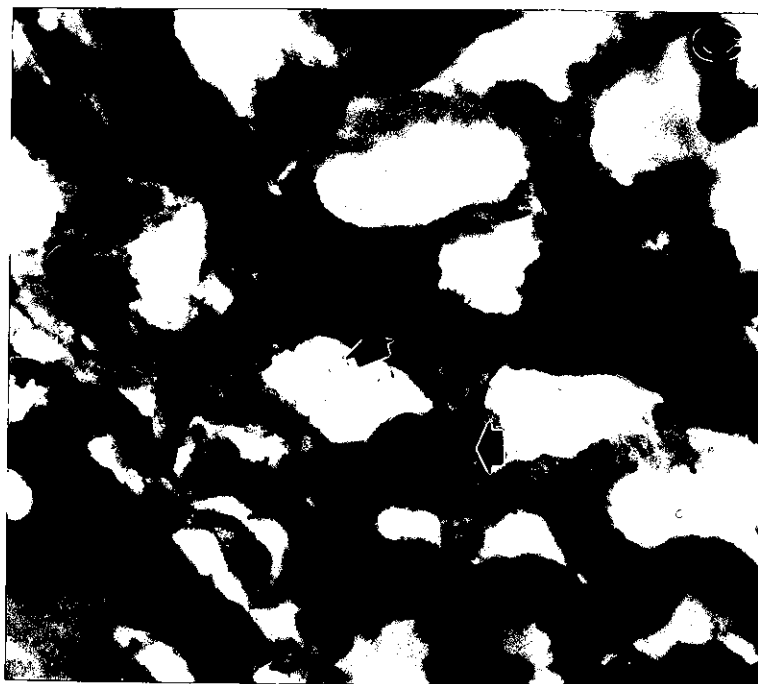


Fig.12. Determinación inmunohistoquímica de las isoformas del RP en un cordoma. Cortes de  $6\mu\text{m}$  de una biopsia se incubaron con anticuerpos monoclonales que reconocen respectivamente: A) Ambas isoformas (RP A+B), B y C) Solamente al RP-B y D) control negativo, el cual fue incubado con suero normal de ratón. Las flechas indican algunos núcleos inmunoreactivos. (A,B,D): 400x; (D): 1000x.

**Tabla 4. Determinación de la expresión de las isoformas al RP en astrocitomas humanos.** Análisis de la expresión de las isoformas del RP en astrocitomas humanos determinados por inmunohistoquímica y RT-PCR. Las dos isoformas del RP fueron determinadas a nivel de la proteína por inmunohistoquímica, los datos indican el número promedio de células inmunoreactivas en diez campos detectadas con los anticuerpos que reconocen a ambas isoformas RP-A+B, así, como con el anticuerpo que reconoce solamente a RP-B. La intensidad de la inmunoreacción se clasificó: (+) baja, (++) moderada, (+++) intensa. En el caso de RT-PCR se amplificaron fragmentos de RP-A+B, RP-B y GAPDH usando RNA obtenido de pacientes con astrocitomas.

Paciente	Edad	Sexo	Grado Histológico	Inmunohistoquímica		RT-PCR	
				RP-AB	RP-B	RP A+B	RP-B
1	30	F	III	(+++)	(++)	Positivo	Positivo
2	37	F	III	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
3	55	F	III	(++)	(++)	Positivo	Positivo
4	26	M	III	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo
5	37	M	III	(+)	(+)	Positivo	Positivo
6	62	M	III	(+)	(+)	Positivo	Positivo
7	45	F	IV	(+)	(++)	Positivo	Positivo
8	59	F	IV	(+)	(+)	Positivo	Positivo
9	25	M	IV	(+)	(+)	ND*	ND*
10	45	M	IV	(+)	(+)	Positivo	Positivo
11	47	M	IV	(+)	Negativo	Positivo	Positivo
12	48	M	IV	(+)	(+)	Positivo	Positivo
13	73	M	IV	(+)	(+)	Positivo	Positivo

(ND\*)= No determinado.

**Tabla 5. Determinación de la expresión de las isoformas al RP en cordomas humanas. Análisis de la expresión de las isoformas del RP en cordomas humanos determinado por inmunohistoquímica y RT-PCR. Las dos isoformas del RP fueron determinadas a nivel de la proteína por inmunohistoquímica, los datos indican el número promedio de células inmunoreactivas en diez campos; detectadas con los anticuerpos que reconoce a ambas isoformas RP-A+B, así, como con el anticuerpo que reconoce solamente a RP-B. La intensidad de la inmunoreacción se clasificó como (+) baja, (++) moderada, (+++) intensa. En el caso de RT-PCR se amplificaron fragmentos de RP A+B, RP-B y GAPDH usando RNA obtenido de pacientes con cordomas.**

Paciente	Edad	Sexo	Inmunohistoquímica		RT-PCR	
			RP A+B	RP-B	RP A+B	RP-B
1	17	F	(+) 20	(+) 5	Positivo	Positivo
2	37	F	(+) 7	(+) 5	Positivo	Positivo
3	38	F	(++) 56	(++) 13	Positivo	Positivo
4	40	F	(+) 13	(+) 11	Positivo	Positivo
5	56	F	(+++ ) 74	(+++ ) 74	Positivo	Positivo
6	56	M	(+) 18	(+) 18	Positivo	Positivo

Cuatro astocitomas grado III presentaron inmunoreactividad para ambas isoformas del RP (4/6), dos casos fueron negativos. Mientras que en los astrocitomas grado IV todos los astrocitomas (7/7), presentaron inmunoreactividad para ambas isoformas del RP y solo un caso fue negativo para el RP-B. Con respecto a la intensidad de la marca como en el número de células inmunoreactivas por campo tanto para los astrocitomas grado III como IV se observó una relación directa entre ambas, esto es, que campos con pocas células inmunoreactivas presentaron una intensidad de marca ligera y por el contrario campos con un gran número de células inmunoreactivas presentaron una intensidad de la marca muy fuerte.

Así, el estudio de la expresión de las isoformas del RP por inmunohistoquímica reveló que todos los astrocitomas grado III positivos para RP expresaron predominantemente la isoforma B. En los siete astrocitomas grado IV que fueron positivos para el RP, cuatro expresaron predominantemente la isoforma B mientras que tres expresaron predominantemente la isoforma A.

Todos los cordomas analizados presentaron inmunoreactividad para las isoformas del RP (6/6). La intensidad de la marca fue directamente proporcional al número de células por campo así 4 presentaron inmunoreactividad ligera de 5-18 células por campo, un caso presentó inmunoreactividad moderada con 56 células por campo y 1 caso mostró inmunoreactividad fuerte con 74 núcleos por campo (Fig 12).

Con respecto a la expresión de las isoformas del RP por inmunohistoquímica, cuatro cordomas expresaron predominantemente la isoforma B y los otros dos casos restantes la isoforma A.

## **RT-PCR**

### Obtención del RNA .

Se extrajo el RNA total de 18 tumores (12 astrocitomas y 6 cordomas) y de una muestra de endometrio humano (utilizado como control positivo) usando tiocianato de guanidina-fenol-cloroformo (Trizol), solamente en una muestra no se pudo extraer el RNA debido a que fue muy poca la cantidad de tejido para poder realizar la extracción. Para observar la integridad del mismo se realizó una electroforesis de las muestras. En el gel se observaron las bandas correspondientes a las subunidades 28S y 18S del RNA ribosomal en buenas condiciones lo cual sirvió como método cualitativo para poder continuar con la amplificación del gen.

### Determinación de las condiciones óptimas de amplificación.

Se establecieron las condiciones óptimas para la amplificación de las isoformas del RP en humano; para ello se realizaron amplificaciones a varias temperaturas de alineamiento (55, 58, 60 y 62°C) de los oligonucleótidos específicos de las isoformas del RP humano y de la enzima GAPDH utilizada como control interno en muestras de endometrio y se utilizaron 30 ciclos de amplificación. Se obtuvo una sola banda de 242 pb para RP-B, otra de 270 pb para RP-AB y otra de 453 pb para GAPDH. Se determinó que la mejor temperatura de alineamiento fue la de 60°C.(Fig. 13). En el control negativo no se observó ninguna señal de amplificación.

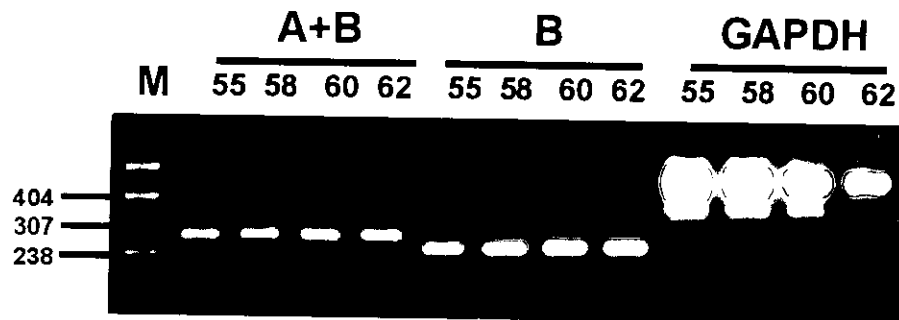


Fig. 13. Electroforesis de los productos de RT-PCR de una muestra de endometrio humano con diferentes temperaturas de alineamiento (55, 58, 60 y 62°C) para la amplificación del fragmento de RP-AB, RP-B y GAPDH humano. La electroforesis muestra los productos de amplificación de ambas isoformas y de GAPDH a partir de RNA de una muestra de endometrio humano. (M) marcador de peso molecular de bajo rango.

### Determinación de la expresión de las isoformas del RP en Astrocitomas

Se determinó la expresión de las isoformas del RP en 12 astrocitomas, 6 de grado III y 6 de grado IV. En 5 astrocitomas grado III hubo amplificación para ambas isoformas del RP (RP-A+B y RP-B). En un caso no hubo amplificación del mensajero del RP, ni se detectó la proteína (Fig 14). En otro caso hubo amplificación del mensajero pero no se detectó la proteína (Tabla 5). En todos los astrocitomas grado IV hubo amplificación para el mensajero de ambas isoformas del RP

La figura. 14 muestra una electroforesis representativa en geles de agarosa de los productos de amplificación por RT-PCR de las isoformas del RP de un astrocitoma grado IV que fue positivo tanto para RP-AB como para RP-B y se



muestra también, un astrocitoma grado III en donde no hubo amplificación para ambas isoformas. En ambos casos se amplificó el gen de GAPDH utilizado como control interno

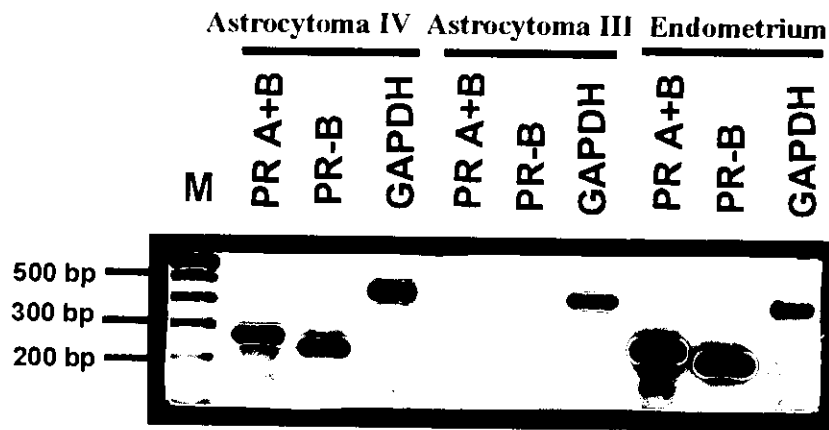


Fig 14. Electroforesis de los productos de amplificación de las isoformas del RP por RT-PCR en un astrocitoma grado III y otro grado IV. Carril 1 marcador de peso molecular de 100 pb, Carril 2-4 amplificación de los fragmentos de RP-AB (273 pb), RP-B (243 pb) y GAPDH (453 pb) de un astrocitoma grado IV. Carril 5-7 amplificación de los fragmentos de RP-AB, RP-B y GAPDH de un astrocitoma grado III y del carril 8-11 la amplificación de RP-AB, RP-B y GAPDH una muestra de endometrio humano como control positivo. En el caso del astrocitoma grado IV como en la muestra de endometrio se observa las bandas correspondientes para cada una de las isoformas analizadas. En el astrocitoma grado III no hay amplificación de las isoformas del RP, solo de GAPDH.

En la figura 15 se muestra el número de astrocitomas grados III y IV que expresaron las isoformas del RP basándose en los resultados del análisis densitométrico de los productos obtenidos por RT-PCR. De los cinco astrocitomas grado III que fueron positivos por RT-PCR todos expresaron predominantemente RP-B, mientras que para los seis astrocitomas grado IV que fueron positivos por RT-PCR, dos expresaron RP-A y cuatro RP-B.

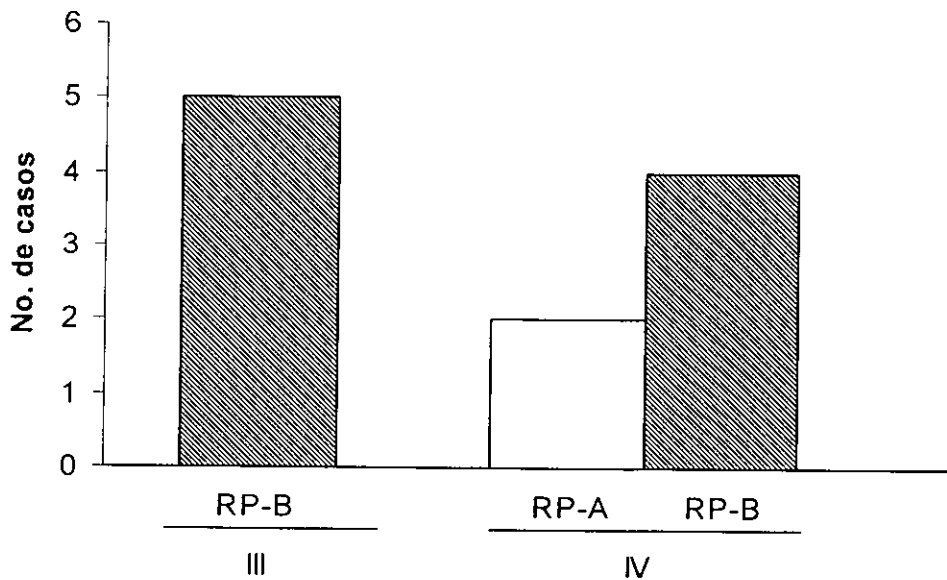


Fig. 15. Número de astrocitomas grados III y IV que expresaron las isoformas del RP basándose en los resultados del análisis densitométrico de los productos obtenidos por RT-PCR. Los cinco astrocitomas grado III que fueron positivos por RT-PCR expresaron predominantemente RP-B, mientras que para los seis astrocitomas grado IV que fueron positivos por RT-PCR, dos expresaron RP-A y cuatro RP-B.

## Determinación de la expresión de las isoformas del RP en Cordomas

Se determinó por RT-PCR la expresión de las isoformas del RP en 6 cordomas. En los 6 casos se detectó la expresión de ambas isoformas del RP (tabla 5). La figura 16 muestra una electroforesis representativa de los productos de amplificación por RT-PCR de las isoformas del RP en geles de agarosa de un cordoma el cual resultó positivo para la amplificación de ambas isoformas del RP al igual que la muestra de endometrio utilizado como control positivo.

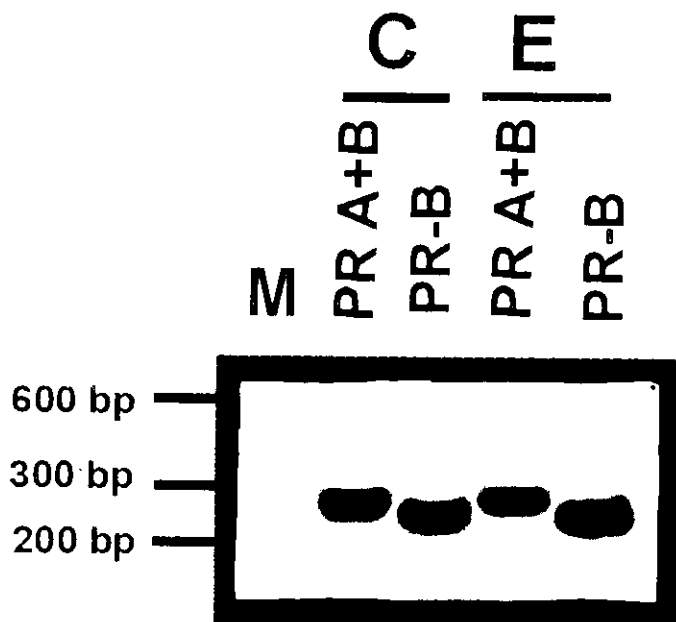


Fig 16. Electroforesis de los productos de amplificación de las isoformas al RP por RT-PCR en un cordoma. Carril 1 marcador de peso molecular de 100 pb, Carril 2,3 amplificación de los fragmentos de RP-AB (273 pb) y RP-B (243 pb) de un cordoma, Carril 4y5 amplificación del fragmento de RP-AB y RP-B de una muestra de endometrio humano utilizada como control positivo. En el caso del cordoma se observa la amplificación de las bandas correspondientes para cada una de las isoformas analizadas.

En la figura 17 se muestra el número de cordomas que expresaron las isoformas del RP basándose en los resultados del análisis densitométrico de los productos obtenidos por RT-PCR. De los seis cordomas que fueron positivos por RT-PCR, dos expresaron predominantemente RP-A y cuatro expresaron RP-B.

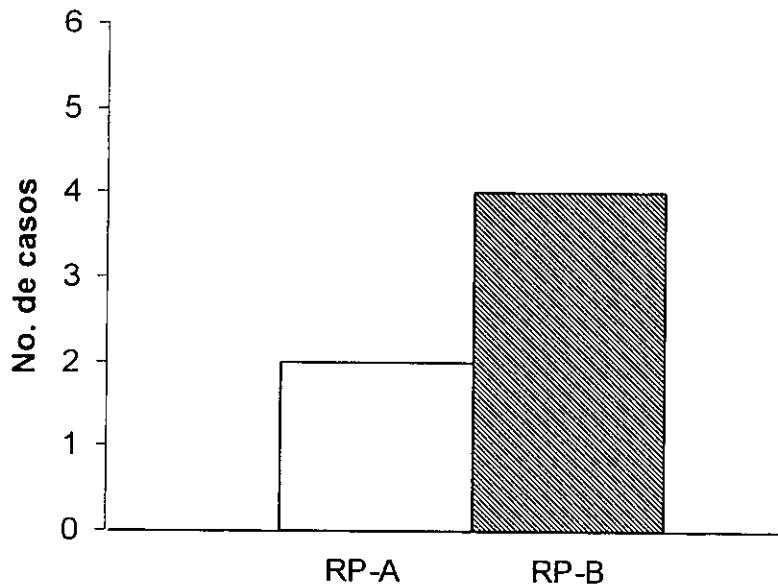


Fig. 17. Número de astrocitomas grados III y IV que expresaron las isoformas del RP basándose en los resultados del análisis densitométrico de los productos obtenidos por RT-PCR. De los seis cordomas que fueron positivos por RT-PCR, dos expresaron predominantemente RP-A y cuatro expresaron RP-B.

## 9. DISCUSIÓN.

En el presente estudio se determinó la expresión de las isoformas del RP en astrocitomas y cordomas humanos, por medio de las técnicas de inmunohistoquímica y RT-PCR. Los resultados demuestran que ambas isoformas del RP se expresaron tanto en astrocitomas como en cordomas y en ambos casos la isoforma predominante fue RP-B.

La P<sub>4</sub> participa en distintos procesos fisiológicos en el Sistema Nervioso Central entre las que destacan la excitabilidad neuronal, la reproducción, y las conductas asociadas a esta (Camacho-Arroyo et al, 1995); muchas de esas acciones están reguladas por su receptor intracelular específico. Numerosos grupos de investigación han reportado la expresión del RP en distintos tumores cerebrales como los meningiomas, los astrocitomas, los craneofaringiomas y otros (Carroll et al., 1993; Waelti et al., 1989; Hsu et al., 1997; Morgan et al., 1991).

La interrogante de conocer si las hormonas esteroides regulan el crecimiento de las distintas neoplasias cerebrales ha sido investigada durante muchos años, partiendo de la observación de que hay tumores cerebrales que se presentan con mayor frecuencia en un sexo que en otro, tal es el caso de los meningiomas, los cuales son más frecuentes en mujeres y el de los astrocitomas que son más frecuentes en hombres (Plunkett et al., 1999). En los astrocitomas analizados en este estudio se confirmó esta misma observación, ya que 8 de los casos fueron hombres y 5 mujeres.

En los astrocitomas analizados en el presente trabajo utilizando las técnicas de inmunohistoquímica y RT-PCR se encontró un alto porcentaje de expresión del RP (89.4%), que es mayor a los reportados en la literatura: Paloletti, 1990 (2%), Poisson, 1990 (25%); Stojkovic, 1989 (28%); Brentani, 1984 (33%); Assimakopoulou et al., 1998 (49%) y Carroll, 1995 (59%).

Con respecto a la relación entre la expresión medida por inmunohistoquímica del RP y los distintos grados de malignidad de los astrocitomas estudiados, se encontró un mayor porcentaje de expresión del RP en los astrocitomas grado IV (85%) en

comparación con los de grado III (66.6%) esta información concuerda con la obtenida anteriormente por Assimakopoulou (1998) quien encuentra que 45% de los astrocitomas grado III y el 59% de los grado IV expresaron RP. En cuanto al análisis por RT-PCR, los resultados de trabajo muestran que en astrocitomas grado III, el 83% presentó el mensajero del RP y en el caso de los de grado IV, el 100%. Carroll en 1995 observó la misma tendencia ya que reportó un 32% de casos positivos para los de grado III y un 62 % en los de grado IV. Una posible explicación a la alta expresión del RP en tumores más avanzados estaría en que pudiera ser el resultado de la desdiferenciación celular entre un grado y otro, como el cambio en la actividad transcripcional de las células tumorales.

En este trabajo se determinó una expresión similar de las isoformas RP tanto a nivel de la proteína como a nivel de mensajero, esto sugiere que la expresión del RP está regulada a nivel transcripcional. Sin embargo, esto fue diferente en dos casos que fueron positivos por RT-PCR pero negativos por inmunohistoquímica. Este resultado puede deberse a la baja expresión del RP que sólo puede detectarse por técnicas más sensibles como la RT-PCR. Otra posibilidad es un control postranscripcional o que por la alta desregulación celular que se presenta en estos grados tumorales la proteína haya sufrido proteólisis en estos astrocitomas y no sea detectada. En el caso del tumor en el que se detectó el RP por inmunohistoquímica y no por RT-PCR, esto puede deberse a que el gen del RP presente mutaciones en la región de reconocimiento para la secuencia de los oligonucleótidos y que no se pueda amplificar el mensajero, pero si se detecte la proteína; también puede deberse a la inestabilidad del mensajero del RP (Tonn, 1997) o a la alteración de factores de transcripción que regulan el promotor del RP.

El RP es regulado a nivel transcripcional por el receptor de estrógenos en muchos tejidos blanco (Graham et al., 1997; Mendoza-Rodríguez, 1999). En el presente trabajo se determinó la expresión del RP pero no del RE, sin embargo los resultados obtenidos con estas mismas muestras en nuestro laboratorio mostraron que la expresión del RE

es baja en los astrocitomas tanto de grado III (66%) como grado IV (85.7%); por lo que, se puede sugerir que en este tipo de tumores la expresión del RP es independiente de los estrógenos lo cual concuerda con lo observado en meningiomas (Blankenstein et al., 1995; Assimakolopoulou et al., 1998).

La caracterización de los receptores a hormonas esteroideas en los tumores cerebrales debe ser considerada para la aplicación de una estrategia terapéutica ya que la presencia del RP como de otros receptores a hormonas esteroideas han sido correlacionada con la respuesta clínica a terapias hormonales en alrededor del 70% de los pacientes con cáncer de mama (Grumberg et al., 1991; Lamberts et al., 1992). Es por ello, que se han desarrollado diversas investigaciones en las que se ha querido establecer cual es la respuesta del tumor en presencia de agonistas o antagonistas a hormonas esteroideas. Por ejemplo, en el tratamiento de líneas celulares de glioblastoma humano como la U87MG con RU486, se observa una clara disminución en el crecimiento del tumor. Sin embargo, estudios *in vitro* con modelos animales, así como los experimentos con pacientes humanos, aún no aportan datos concluyentes sobre las condiciones óptimas para la aplicación de una terapia hormonal para estos tumores.

En este trabajo se encontró que los astrocitomas grado III como grado IV expresan predominantemente la isoforma RP-B tanto por inmunohistoquímica como por RT-PCR. Esta expresión diferencial de las isoformas ha sido reportada en otros tumores por Fujimoto 1997, quien reporta que hay una alteración en la expresión del RNAm de las isoformas del RP en cánceres de endometrio, cervix y ováricos en etapas menos avanzadas y metastásicos. Siendo RP-B la isoforma que tiende a expresarse en tumores metastáticos en comparación con la isoforma RP-A, la cual se expresa más o en la misma proporción que RP-B en tumores menos avanzados, esto sugiere que la transcripción del RNAm de RP-A disminuye con la evolución tumoral, mientras que la del RP-B aumenta en tumores malignos.

Por otro lado, la activación de RP-B y no la de RP-A en líneas de cancer de mama induce la expresión de la monooxidasa que contiene flavina, la cual esta involucrada en la activación metabólica de drogas como el tamoxifen a intermediarios cancerígenos (Miller et al., 1997).

Además, la activación de la sobreexpresión de RP-A en células de cancer de mama modifica tanto la expresión de genes regulados por  $P_4$ , como la morfología de las células (McGowan et al., 1999); así, la activación de RP-A y RP-B puede traer varios efectos en la progresión del tumor y la metastasis

En los cordomas se obtuvieron más pacientes del sexo femenino que del masculino. Aunque en este tipo de tumores no se ha encontrado aún alguna tendencia a mayor aparición en hombres o mujeres, algunas observaciones reportan que al ser tratados con radioterapia, las mujeres presentan menor tiempo de sobrevida comparadas con los hombres (tiempo medio de vida para las mujeres 7 años 2 meses y para los hombres 11 años 9 meses; O'Connell et al., 1994), lo mismo sucede con las mujeres postmenopáusicas en comparación con las premenopáusicas, lo que sugiere una relación entre el desarrollo de los cordomas y las hormonas esteroides.

En los cordomas analizados se demostró la expresión de las isoformas del RP en este tipo de tumores cerebrales. Este resultado concuerda con los reportados por Martínez en 1984 y Stojkovic (1990), aunque en ambos casos solo se analizó un tumor utilizando el ensayo de unión. Este es el primer trabajo donde se demuestra claramente la expresión del RP en cordomas tanto a nivel del RNAm como a nivel de la proteína con la utilización de las técnicas inmunohistoquímica y RT-PCR. Todos los cordomas expresaron ambas isoformas el RP sin embargo, la expresión de RP-B fue mayor que RP-A tanto por RT-PCR como por inmunohistoquímica. La expresión similar de las isoformas del RP medida tanto a nivel de la proteína como a nivel del mensajero sugiere que la expresión del RP en cordomas puede ser regulada a nivel transcripcional.



Se ha encontrado una relación directa entre la malignidad de otros tumores cerebrales y la presencia del RP (Brandis et al., 1993). En los meningiomas la expresión del RP es considerada como un factor pronóstico favorable (Hsu, 1997), sin embargo, hasta el momento no se ha establecido una relación entre la presencia del RP y el grado de malignidad de los cordomas. En el presente trabajo se determinó la expresión del RP pero no del RE, Sin embargo, por resultados obtenidos en nuestro laboratorio con estos mismos tumores se detectó la expresión del RE- $\alpha$  en el 100% de los casos por lo que puede sugerirse que en este tipo de tumores la expresión del RP está regulada por los estrógenos lo cual requiere de futuras investigaciones para su comprobación.

La importancia de conocer como se expresan las isoformas del RP en los tumores del Sistema Nervioso Central, es debida al hecho de que la P<sub>4</sub> puede provocar distintas respuestas celulares dependiendo de la expresión de una isoforma o de otra. En el presente trabajo RP-B predominó en los astrocitomas de grado III y IV así como en los cordomas estudiados. Esta expresión concuerda con otros tumores de alto grado de malignidad como el caso de tumores metastásicos del endometrio y en las líneas celulares derivadas de cáncer de endometrio los cuales expresan predominantemente RP-B (Kumar et al, 1998). La predominancia de una isoforma sobre otra también puede contribuir en la progresión del tumor y el desarrollo de la metástasis.

Este es un estudio en el que se determinó la expresión de las isoformas de RP en astrocitomas y cordomas y que puede ser la base para otras investigaciones que lleven a entender los mecanismos que regulan la expresión de las isoformas del RP tanto en cordomas y astrocitomas y su posible participación en el crecimiento tumoral. Eventualmente, se espera encontrar nuevas alternativas para el control de los tumores cerebrales y mejorar la esperanza de vida de los pacientes.

## 10. Conclusiones

-Los astrocitomas y los cordomas humanos presentan una expresión diferencial de las isoformas del RP.

-La isoforma B del RP se expresa predominantemente en astrocitomas y en cordomas humanos tanto a nivel del RNAm como a nivel de la proteína.

-No hay relación entre la edad, sexo y localización del tumor y la expresión de las isoformas del RP.

## 11. REFERENCIAS

- Allan GF, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW., 1992. Ligand-dependent conformational changes in the progesterone receptor are necessary for events that follow DNA binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 89(24):11750-4.
- Assimakopoulou M., Sotitopoulou B, Maraziotis T., Varakis., 1998. Does sex steroid receptor status have any pronostic or predictive significance in brain astrocytomas tumors? *Clin. Neuropathol.* 17: 27-34.
- Bain DL, Franden MA, McManaman JL, Takimoto GS, Horwitz KB., 2000. The N-terminal region of the human progesterone A-receptor. Structural analysis and the influence of the DNA binding domain. *J. Biol. Chem.* 275(10):7313-20.
- Beato M., 1987. Induction of transcription by steroid hormones. *Biochim. Biophys. Acta* 910(2):95-102.
- Beato M., 1989. Gene regulation by steroid hormones. *Cell.* 56(3):335-44.
- Beier HM., 1968. Uteroglobin a hormone-sensitive endometrial protein involved in blastocyst development. *Biochim. Biophys. Acta.* 160(2):289-91.
- Blaauw G, Koudstaal J, Blankenstein MA, Debets-Te Baerts M, Gijzen AH., 1995. Progestin receptors in meningiomas. Comparison of cytosolic assays with immunocytochemical identification in cryostat and paraffin sections. *Acta Neurochir.* 134(1-2):83-7.
- Blankenstein MA, Blaauw G, Lamberts SW, Mulder E., 1983. Presence of progesterone receptors and absence of oestrogen receptors in human intracranial meningioma cytosols. *Eur. J. Cacer Clin. Oncol.* 19(3):365-70.
- Blankenstein MA, Koehorst SG, van der Kallen CJ, Jacobs HM, van Spriel AB, Donker GH, van't Verlaat JW, Blaauw G, Thijssen JH., 1995. Oestrogen receptor independent expression of progestin receptors in human meningioma-a review *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 53(1-6):361-5.

- Bouillot P, Pelliser J, Devictor B., 1994. Quantitative imaging of estrogen and progesterone receptor, estrogen-regulated protein and growth factor: Immunocytochemical assay in 52 meningiomas. Correlation with clinical and morphological data. *J. Neurosurgery*. 81: 756-773.
- Bozzetti C, Camisa R, Nizzoli R, Manotti L, Guazzi A, Naldi N, Mazza S, Nizzoli V, Cocconi G., 1995. Estrogen and progesterone receptors in human meningiomas: biochemical and immunocytochemical evaluation. *Surg. Neurol.* 43(3):230-3.
- Brandis A, Mirzai S, Tatagiba M, Walter GF, Samii M, Ostertag H., 1993. Immunohistochemical detection of female sex hormone receptors in meningiomas: correlation with clinical and histological features. *Neurosurgery* 33(2):212-7.
- Brentani MM, Lopes MT, Martins VR, Plese JP., 1984. Steroid receptors in intracranial tumors. *Clin. Neuropharmacol.* 7(4):347-50.
- Brodeur P, Mockus M, McCullough R, Moore LG., 1986. Progesterone receptors and ventilatory stimulation by progestin. *J. Appl. Physiol.* 60(2):590-5.
- Camacho-Arroyo I, Ruiz A, Gamboa-Dominguez A, Pérez-Palacios G, Cerbón MA., 1994. Immunohistochemical localization of intracellular progesterone and glucocorticoid receptors in the rabbit lung. *J. Endocrinol.* 142(2):311-6.
- Camacho-Arroyo I, Pasapera AM, Pérez-Palacios G, Cerbón MA., 1995. Progesterone and its metabolites in central nervous system function. *Rev. Invest. Clin.* 47(4):329-40.
- Camacho-Arroyo I, Pasapera AM, Cerbón MA., 1996. Regulation of progesterone receptor gene expression by sex steroid hormones in the hypothalamus and the cerebral cortex of the rabbit. *Neurosci. Lett.* 214(1):25-8.
- Camacho-Arroyo I, Guerra-Araiza C, Cerbón M A., 1998. Progesterone receptor isoforms are differentially regulated by sex steroids in the rat forebrain. *Neuroreport.* 9(18):3993-6.

- Camacho-Arroyo I, Hernández-Gollas R, Manjarrez J, Alvarado R., 1999. Progesterone microinjections into the pontine reticular formation modify sleep in male and female rats. *Neurosci. Lett.* 269(1):9-12.
- Carroll RS, Glowacka D, Dashner K, Black PM., 1993. Progesterone receptor expression in meningiomas. *Cancer Res.* 53(6):1312-6.
- Carroll RS, Zhang J, Dashner K, Sar M, Black PM., 1995. Steroid hormone receptors in astrocytic neoplasms. *Neurosurgery* 37(3):496-503.
- Chambraud B, Berry M, Redeuilh G, Chambon P, Baulieu EE., 1990. Several regions of human estrogen receptor are involved in the formation of heat shock protein-90 complex. *J Biol. Chem.* 265:20686-20691.
- Christensen K, Estes PA, Onate SA, Beck CA, DeMarzo A, Altmann M, Lieberman BA, St John J, Nordeen SK, Edwards DP., 1991. Characterization and functional properties of the A and B forms of human progesterone receptors synthesized in a baculovirus system. *Mol. Endocrinol.* 5(11):1755-70.
- Clarke CL, 1993. Ovarian steroid hormone receptors and their mechanisms of action: In race GE, Brennecke SP (eds) *Molecular aspects of placental and fetal Autacoids*. CRC Press, Inc, Boca Raton, FL, pp 27-54.
- Clement PB, Young RH, Scully RE., 1991. Clinical syndromes associated with tumors of the female genital tract. *Semin. Diagn. Pathol.* 84: 234-49.
- Clemm DL, Macy BL, Santiso-Mere D, McDonnell DP., 1995. The critical cellular components which distinguish between hormone and antihormone activated progesterone receptor. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 53(1-6):487-95.
- Clemm DL, Sherman L, Boonyaratankornkit V, Schrader W, Weigel N, Edwards DP., 2000. Differential Hormone-Dependent phosphorylation of progesterone receptor A and B forms revealed by a phosphoserine site-specific monoclonal antibody. *Mol. Endocrinol* 14(1):52-65.
- Connely OM, Keffelberger DM, Tsa W, Schrader WT, O'Maley B., 1989. The chicken progesterone receptor A and B isoforms are products of alternative translation initiation event *J. Biol Chem.* 264:14062-64.

- Csapo AI, Resch BA., 1979. Induction of preterm labor in the rat by antiprogesterone. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 134(7):823-7.
- Dalkin AC, Paul SJ, Haisenleder DJ, Ortolano GA, Yasin M, Marshall JC., 1992. Gonadal steroids effect similar regulation of gonadotrophin subunit mRNA expression in both male and female rats *J. Endocrinol.* 132(1):39-45.
- DeVita, 1995. Cáncer, Principios y Práctica de Oncología, México pp 1444-1451.
- Dluzen DE, Ramírez VD., 1991. Modulatory effects of progesterone upon dopamine release from the corpus striatum of ovariectomized estrogen-treated rats are stereo-specific. *Brain. Res.* 538(1):176-9.
- Donnell MS, Meyer GA, Donegan WL., 1979. Estrogen-receptor protein in intracranial meningiomas. *J. Neurosurg.* 50(4):499-502.
- Escourolle R, Poirier J., 1971. Electron microscope study of nervous system tumors. *Neurochirurgie* 17 (Suppl 1):25-49.
- Feil PD, Glasser SR, Toft DO, O'Malley BW., 1972. Progesterone binding in the mouse and rat uterus. *Endocrinol.* 91(3):738-46.
- Félix I., 1995. Atlas de tumores cerebrales, México D. F. Interamericana pp1-150
- Fujimoto J, Ichigo S, Reiko H, Sakaguchi H, Tamaya T., 1997. Clinical implication of expression of progesterone receptor form A and B mRNAs in secondary spreading of gynecologic cancers. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 62(5-6):449-54.
- Ganong WF., 1993. Blood, pituitary, and brain renin-angiotensin systems and regulation of secretion of anterior pituitary gland. *Front. Neuroendocrinol.* 1993,14(3):233-239.
- Giangrande PH, Pollio G, McDonnell DP., 1997. Mapping and characterization of the functional domains responsible for the differential activity of the A and B isoforms of the human progesterone receptor. *J. Biol. Chem.* 272(52):32889-900
- Giangrande PH, McDonnell DP., 1999. The A and B isoforms of the human progesterone receptor: two functionally different transcription factors encoded by a single gene. *Recent. Prog. Horm. Res.* 54:291-313.

- González-Morán G, Camacho-Arroyo I., 1998. Histomorphometric and progesterone receptor immunohistochemical analysis in the oviduct of newly hatched chicks treated with follicle-stimulating hormone during embryonic development. *Anat. Histol. Embryol.* 27(4):277-82.
- Gorospe WC, Freeman ME., 1985. Effects of placenta and maternal serum on prolactin secretion *in vitro*. *Biol. Reprod.* 32(2):279-83.
- Gore-Langton R. E. Armstrong, D.T., 1988. Follicular steroidogenesis and its control. In: Physiology of Reproduction. Knobil E., Neil J. D et al (Eds) Vol. 1 pp.331-335 . Raven Press Ed. New York.
- Graham JD, Yeates C, Balleine RL, Harvey SS, Milliken JS, Bilous AM, Clarke CL., 1995. Characterization of progesterone receptor A and B expression in human breast cancer. *Cancer Res.* 55(21):5063-8.
- Graham JD, Clarke CL., 1997. Physiological action of progesterone in target tissues. *Endocr. Rev.* 18(4):502-19.
- Green IC, Howell SL, El Seifi S, Perrin D., 1978. Binding of 3H-progesterone by isolated rat islets of Langerhans. *Diabetol.* 15:349-355
- Grunberg SM, Daniels AM, Muensch H, Daniels JR, Bernstein L, Kortés V, Weiss MH., 1987. Correlation of meningioma hormone receptor status with hormone sensitivity in a tumor stem-cell assay. *J. Neurosurg.* 66(3):405-8.
- Grunberg SM, Weiss MH, Spitz IM, Ahmadi J, Sadun A, Russell CA, Lucci L, Stevenson LL., 1991. Treatment of unresectable meningiomas with the antiprogestosterone agent mifepristone. *J. Neurosurg.* 74(6):861-6.
- Gautier T, Dauphin-Villemant C, Andre C, Masson C, Arnoult J, Hernandez-Verdun D., 1992. Identification and characterization of a new set of nucleolar ribonucleoproteins which line the chromosomes during mitosis. *Exp Cell Res.* 200(1):5-15
- Haber W., 1994. Molecular Biology of Brain Tumors. *Neurosurg. Clin. of North America* 5: 127-132.

- Halper J, Colvard DS, Scheithauer BW, Jiang NS, Press MF, Graham ML 2d, Riehl E, Laws ER Jr, Spelsberg TC., 1989. Estrogen and progesterone receptors in meningiomas: comparison of nuclear binding, dextran-coated charcoal, and immunoperoxidase staining assays. *Neurosurgery* 25(4):546-52.
- Hayward E, Whitwell H, Paul KS, Barnes DM., 1984. Steroid receptors in human meningioma. *Clin. Neuropharmacol.* 7(4):351-6.
- Heffelfinger MJ, Dahlin DC, MacCarty CS, Beabout JW., 1973. Chordomas and cartilaginous tumors at the skull base. *Cancer* 32(2):410-20.
- Honegger J, Renner C, Fahlbusch R, Adams EF., 1997. Progesterone receptor gene expression in craniopharyngiomas and evidence for biological activity. *Neurosurgery* 41(6):1359-63.
- Horwitz KB, McGuire WL., 1975. Specific progesterone receptors in human breast cancer. *Steroids* 25:497-505.
- Horwitz KB, Jackson TA, Bain DL, Richer JK, Takamoto GS, Tung L., 1996. Nuclear receptor coactivators and repressors. *Mol. Endocrinol.* 10:1167-1177.
- Hurd C, Khatteree N, Alban P, Nag K, Jhanwar SC, Dinda S, Moudgil VK., 1995. Homonal regulation of the p53 tumor suppressor protein in T47-D human breast carcinoma cell line *J. Biol. Chem.* 270: 28507-28510.
- Hsueh AJ, Adashi EY, Jones PB, Welsh TH Jr., 1984. Hormonal regulation of the differentiation of cultured ovarian granulosa cells. *Endocr. Rev.* 5(1):76-127.
- Hsu. DW: Efird JT, Headley-Whyte ET., 1997. Progesterone and estrogen receptors in meningiomas: Prognostic considerations. *J. Neurosurgery* 33:113-120.
- Huse B, Verca SB, Matthey P, Rusconi S., 1998. Definition of a negative modulation domain in the human progesterone receptor. *Mol. Endocrinol.* 12(9):1334-42.
- Hutchison JS, Nelson PB, Zeleznik AJ., 1986. Effects of different gonadotropin pulse frequencies on *corpus luteum* function during the menstrual cycle of rhesus monkeys. *Endocrinology* 119(5):1964-7.1



- Ing NH, Beekman JM, Kessler DJ, Murphy M, Jayaraman K, Zendegui JG, Hogan ME, O'Malley BW, Tsai MJ., 1993. *In vivo* transcription of a progesterone-responsive gene is specifically inhibited by a triplex-forming oligonucleotide. *Nucleic. Acids Res.* 21(12):2789-96.
- Inskip T., 1996. Brain and the other Nervous sistem, Cancer rates and riski 4<sup>th</sup> Edition. 562-590.
- Ironside JW, Battersby RD, Dangerfield VJ, Timperley WR, Underwood JC., 1986. Progesterone receptors in meningiomas: morphometric assessment of vascularity and cellularity on near facsimile cryostat sections. *J. Clin. Pathol.* 39(7):810-1.
- Karavolas HJ, Hodges DR., 1990. Neuroendocrine metabolism of progesterone and related progestins. *Ciba Found Symp.* 153:22-44.
- Kastner P, Bocquel MT, Turcotte B, Garnier JM, Horwitz KB, Chambon P, Gronemeyer H., 1990. Transient expression of human and chicken progesterone receptors does not support alternative translational initiation from a single mRNA as the mechanism generating two receptor isoforms. *J. Biol. Chem.* 265(21):12163-7.
- 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(5):1603-14.
- Ke FC, Ramirez VD., 1987. Membrane mechanism mediates progesterone stimulatory effect on LHRH release from superfused rat hypothalami in vitro. *Neuroendocrinology* 45(6):514-7.
- Kepes J.J., 1982. Meningiomas: biology pathology and differential diagnosis. In: G Masson (ed.). Masson monographs in diagnostic pathology 4.pp. 1-18. Plenum. New York.

- Khalid H., 1994. Immunohistochemical study of estrogen receptor-related antigen, progesterone and estrogen receptors in human intracranial meningiomas. *Cancer* 74(2):679-85.
- 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(11):2133-40.
- Kraus WL, Katzenellenbogen BS., 1993. Regulation of progesterone receptor gene expression and growth in the rat uterus: modulation of estrogen actions by progesterone and sex steroid hormone antagonists. *Endocrinology* 132(6):2371-96.
- Kumar NS, Richer J, Owen G, Litman E, Horwitz KB, Leslie KK., 1998. Selective down-regulation of progesterone receptor isoform B in poorly differentiated human endometrial cancer cells: implications for unopposed estrogen action. *Cancer Res.* 58:1860-65.
- Lamberts SW, Koper JW, Reubi JC, Krenning EP., 1992. Endocrine aspects of the diagnosis and treatment of primary brain tumours. *Clin. Endocrinol.* 37(1):1-10.
- Lessey BA, Alexander PS, Horwitz KB., 1983. The subunit structure of human breast cancer progesterone receptors: characterization by chromatography and photoaffinity labeling. *Endocrinology* 112(4):1267-74.
- Litwack G., 1992. Remembrance: steps leading to the identification, purification, and characterization of the glucocorticoid receptor. *Endocrinology* 130(5):2433-4.
- Magrassi L, Bono F, Milanese G, Butti G., 1992. Vitamin D receptor expression in human brain tumors *J. Neurosurg. Sci.* 36(1):27-30.
- Mahesh V, Brann D., Hendry L., 1996. Diverse modes of action of progesterone and its metabolites. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 56: 209-219
- Mankin HJ, Gebhardt MC., 1985. Advances in the management of bone tumors. *Clin. Orthop.* 200:73-84.

- Markwalder TM, Zava DT, Goldhirsch A, Markwalder RV, Masson EA, 1983. Estrogen and progesterone receptors in meningiomas in relation to clinical and pathologic features. *Surg. Neurol.* 20(1):42-7.
- Martínez R, Figueras A, Vaquero J., 1984. Estrogen and progesterone receptors in intracranial tumors. *Clin. Neurophatol.* 7(4): 338-342.
- Matsuda Y, Kawamoto K, Kiya K, Kurisu K, Sugiyama K, Uozumi T., 1994. Antitumor effects of antiprogestones on human meningioma cells in vitro and in vivo. *J. Neurosurg.* 80(3):527-34.
- McGowan EM, Clarke CL., 1999. Effect of overexpression of progesterone receptor A on endogenous progestin-sensitive endpoints in breast cancer cells. *Mol. Endocrinol.* 13:1657-1665.
- Meizel S, Turner KO., 1991. Progesterone acts at the plasma membrane of human sperm. *Mol. Cell. Endocrinol.* 77(1-3):R1-5.
- Mendoza-Rodriguez CA, Camacho-Arroyo I, García GA, Cerbón MA., 1999. Variations of progesterone receptor and c-fos gene expression in the rat uterus after treatment with norethisterone and its A-ring reduced metabolites. *Contraception* 59(5):339-43.
- Michelsen JJ, New PF., 1969. Brain tumour and pregnancy. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 32(4):305-7.
- Miller MM, James RA, Richer JK, Gordon DF, Wood WM, Horwitz KB, 1997. Progesterone regulated expression of flavin-containing monooxygenase 5 by B-isoform of progesterone receptor: implications for tamoxifen carcinogenicity. *J. Clin. Matab.* 82:2956.
- Milgrom E, Baulieu EE., 1970. Progesterone in the uterus and the plasma. II. The role of hormone availability and metabolism on selective binding to uterus protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 40(3):723-3.
- Mirashi M, Atger M, d'Auriol L, Loosfelt H, Meriel C, Fridlansky F, Guiochon-Mantel A, Galibert F, Milgrom E., 1987. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 143 (2):740-748.

- Misrahi M, Venencie PY, Saugier-veber P, Sar S, Dessen P, Milgrom E, 1993. Structure of the human progesterone receptor gene *Biochem. Biophys. Acta* 1216(2) 289-92.
- Morgan JK, Olson JJ., 1991. Steroid hormones and meningiomas. In: Schmidek HH,eds. Meningiomas and their surgical management. Philadelphia: WB. Saunders Co.:48-55.
- Murphy LJ, Sutherland RL, Stead B, murphy LC, Lazarus L., 1986. Progestin regulation of epidermal growth factor receptor in human mammary carcinoma cells. *Cancer Res.* 46: 728-734.
- Musgrove EA, Lee Cs, Sutherland RL., 1991. Progestins both stimulate and inhibit breast cell cycle progression while increasing expression of transforming growth factor  $\alpha$ , epidermal growth factor receptor, *c-fos* and *c-myc* genes. *Mol. Cell. Biol.* 11:5032-5043.
- Musgrove EA, Hamilton JA, ,Lee Cs, Sweenwy KJ, Watts CK, Sutherland RL., 1993. Growth factor, steroid, and steroid antagonist regulation on cyclin gene expression associated with changes in T47-D human breast cancer cell progression. *Mol. Cell. Biol.* 13:3577-3587.
- Nguyen JP, Caron JP, Gaston A, Lovarn R, Poirier J, 1984. Anatomico-radiological correlations in astrocytic cerebral tumors. *Neurochirurgie* 30(1):11-15.
- O'Connell JX, Renard LG, Liebsch NJ, Efrid JT, Munzenrider JE, Rosenberg AE., 1994. Base of skull chordoma. *Cancer* 74: 2261-2267.
- Olson JJ, Beck DW, Schlechte JA, Loh PM., 1987. Effect of the antiprogestone RU-38486 on meningioma implanted into nude mice. *J. Neurosurg.* 66(4):584-7.
- Paoletti P, Butti G, Zibera C, Scerrati M, Gibelli N, Roselli R, Magrassi L, Sica G, Rossi G, Robustelli della Cuna G., 1990. Characteristics and biological role of steroid hormone receptors in neuroepithelial tumors. *J. Neurosurg.* 73(5):736-42.
- Passinen S, Haverinen M, Pekki A, Rauta J, Paranko J, Syvala H, Tuohimaa P, Yikomi T., 1999. Only a small portion of cytoplasmic progesterone receptor is associated with Hsp 90 in vivo. *J. Cell.Biochem.* 74:458-467.

- Pearce PT, Khalid BAK, Funder JW., 1983. Progesterone receptors in rat thymus. *Endocrinology* 113:1287-1291.
- Pérez-Palacios, 1985. Mecanismos de acción de hormonas esteroides en bioquímica e inmunología. Vol 2. Cap VI, Ed Hicks, J y Diaz- Agaya J.C. UNAM. México. 346-370.
- Perrot-Applanat M, David-Ferreira JF., 1982. Immunocytochemical localization of progesterone-binding protein (PBP) in guinea-pig placental tissue. *Cell Tissue Res.* 223(3):627-39.
- Perrot-Applanat M, Groyer-Picard MT, Garcia E, Lorenzo F, Milgrom E., 1988. Immunocytochemical demonstration of estrogen and progesterone receptors in muscle cells of uterine arteries in rabbits and humans. *Endocrinology* 123(3):1511-9.
- Petitti N, Etgen AM., 1992. Progesterone promotes rapid desensitization of alpha 1-adrenergic receptor augmentation of cAMP formation in rat hypothalamic slices. *Neuroendocrinology* 55(1):1-8.
- Pinski J, Halmos G, Shirahige Y, Wittliff JL, Schally AV., 1993. Inhibition of growth of the human malignant glioma cell line (U87MG) by the steroid hormone antagonist RU486. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 77(5):1388-92 .
- Pliskow S, Herbst SJ, Saiontz HA, Cove H, Ackerman RT., 1995. Intracranial meningioma with positive progesterone receptors. A case report *J. Reprod. Med.* 40(2):154-6.
- Plunkett RJ, Lis A, Barone TA, Fronckowiak MD, Greenberg SJ., 1999. Hormonal effects on glioblastoma multiforme in the nude rat model. *J. Neurosurg.* 90(6):1072-1080.
- Poisson M, Pertuiset BF, Hauw JJ, Philippon J, Buge A, Moguilewsky M, Philibert D., 1983. Steroid hormone receptors in human meningiomas, gliomas and brain metastases. *J. Neurooncol.* 1(3):179-89.

- Pollow K, Boquoi E, Baumann J, Schmidt-Gollwitzer M, Pollow B., 1977. Comparison of the in vitro conversion of estradiol-17 beta to estrone of normal and neoplastic human breast tissue. *Mol. Cell. Endocrinol.* 6(4-5):333-48.
- Prendergast P, Pan Z, Edwards DP., 1996. Progesterone receptor-induced bending of its target DNA: distinct effects of the A and B receptor forms. *Mol. Endocrinol.* 10(4):393-407.
- Press MF, Greene GL., 1988. Localization of progesterone receptor with monoclonal antibodies to the human progestin receptor. *Endocrinology* 122(3):1165-75
- Ransom DT, Ritland SR, Moertel CA, Dahl RJ, O'Fallon JR, Scheithauer BW, Kimmel DW, Kelly PJ, Olopade OI, Diaz MO, 1992. Correlation of cytogenetic analysis and loss of heterozygosity studies in human diffuse astrocytomas and mixed oligo-astrocytomas. *Gen. Chrom. Cancer* 5(4):357-74.
- Rodriguez R, Carson MA, Weigel NL, O'Malley BW, Schrader WT, 1990. Dimerization of the chicken progesterone receptor in vitro can occur in the absence of hormone and DNA. *Mol Endocrinol.* 4(12):1782-90.
- Rothchild I., 1983. Role of progesterone in initiating and maintaining pregnancy. In: Bardin CW, Milgrom E, Mauvais-Jarvis P (Eds) Progesterone and progestins. Raven Press, New York, pp 219-229.
- Rubinstein AB, Loven D, Geier A, Reichenthal E, Gadoth N., 1994. Hormone receptors in initially excised versus recurrent intracranial meningiomas. *J. Neurosurg.* 81(2):184-7.
- Sartorius CA, Groshong SD, Miller LA, Powell RL, Tung L, Takimoto GS, Horwita KB. 1994 New T47D breast cancer cell lines for the independent study of progesterone B and A receptors: only antiprogestin occupied B receptors are switched to transcriptional agonist by Camp. *Cancer Res.* 54 (14):3868-77.
- Savouret JF, Misrahi M, Milgrom E. 1990 Molecular action of progesterone. *Int J. Biochem.* 22(6):579-94.

- Schaeffer C, Roos J, Aron C. 1990 Lordosis behavior in intact male rats: effects of hormonal treatment and/or manipulation of the olfactory system. *Horm Behav*; 24(1):50-61.
- Schrader WT, Birnbaumer ME, Hughes MR, Weigel NL, Grody WW, O'Malley BW., 1981. Studies on the structure and function of the chicken progesterone receptor. *Recent. Prog. Horm. Res.* 37:583-633.
- Schowalter DB, Sullivan WP, Maihle NJ, Dobson ADW, Soneely OM'Malley BW, Toft DO., 1991. Characterization of progetserone receptor binding to the 90- and 70-kDA heat shock proteins. *J. Biol. Chem.* 266:21165-21173.
- Schoonen WG, Dijkema R, de Ries RJ, Wagenaars JL, Joosten JW, de Gooyer ME, Deckers GH, Kloosterboer HJ., 1998. Human progesterone receptor A and B isoforms in CHO cells. II. Comparison of binding, transactivation and ED50 values of several synthetic (anti)progestagens in vitro in CHO and MCF-7 cells and invo in rabbits and rats. *J Steroid Biochem. Mol. Biol.* 64(3-4):157-70.
- Sorva A, Risteli J, Risteli L, Valimaki M, Tilvis R., 1991. Effects of vitamin D and calcium on markers of bone metabolism in geriatric patients with low serum 25-hydroxyvitamin D levels. *Calcif. Tissue Int.* 49 Suppl:S88-9.
- Speirs V, Boyle-Walsh E, Fraser WD., 1997. Constitutive co-expression of estrogen and progesterone receptor mRNA in human meningiomas by RT-PCR and response of in vitro cell cultures to steroid hormones. *Int. J. Cancer* 72(5):714-9.
- Stojkovic RR, Jovancevic M, Santel DJ, Grcevic N, Gamulin S., 1992. Sex steroid receptor in intracranial tumors. *Cancer* 65:1968-70.
- Susuki T, Sasano H, Kimura N, Tamura M, Fukaya T, Yajima A, Nagura H., 1994. Immunohistochemical distribution of progesteterone, androgen and oestrogen receptor in human ovary during the menstrual cycle: relationship to expression of steroidogenic enzymes. *Hum. Reprod.* 9:1589-1595.

- Takimoto GS, Hovland AR, Tasset DM, Melville MY, Tung L, Horwitz KB., 1996. Role of phosphorylation on DNA binding and transcriptional functions of human progesterone receptors. *J. Biol. Chem.* 271(23):13308-1.
- Terner C., 1977. Progesterone and progestins in the male reproductive system. *Ann NY Acad. Sci.* 286:313-320
- Tesarik J, Mendoza C, Moos J, Fenichel P, Fehlmann M., 1992. Progesterone action through aggregation of a receptor on the sperm plasma membrane. *FEBS Lett.* 1308(2):116-20.
- Theveny B, Bailly A, Rauch C, Rauch M, Delain E, Milgrom E., 1987. Association of DNA-bound progesterone receptors. *Nature* 329(6134):79-81.
- Tonn JC, Ott MM, Bouterfa H, Kerkau S, Kapp M, Muller-Hermelink HK, Roosen K., 1997. Inverse correlation of cell proliferation and expression of progesterone receptors in tumor spheroids and monolayer cultures of human meningiomas. *Neurosurgery* 41(5):1152-9.
- Topper YJ, Freeman CS., 1980. Multiple hormone interactions in the developmental biology of the mammary gland. *Physiol Rev* 60: 1049-1106.
- Tora L, Gronemeyer H, Turcotte B, Gaub MP, Chambon P., 1988. The N-terminal region of the chicken progesterone receptor specifies target gene activation. *Nature* 333(6169):185-8.
- Tung L, Mohamed MK, Hoeffler JP, Takimoto GS, Horwitz KB., 1993. Antagonist-occupied human progesterone B-receptors activate transcription without binding to progesterone response elements and are dominantly inhibited by A-receptors. *Mol Endocrinol.* 7(10):1256-6.
- Valenzuela Z., 1990. Neuropatología de meningiomas serie del hospital de especialidades Centro Medico la Raza, 1980-89 (10 años) pp 58.
- Vegeto E, Shahbaz MM, Wen DX, Goldman ME, O'Malley BW, McDonnell DP., 1993. Human progesterone receptor A form is a cell- and promoter-specific repressor of human progesterone receptor B function. *Mol. Endocrinol.* 7(10):1244-55.



- Waelti ER, Marlwald TM., 1989. Immunocytochemical evidence of progesterone receptors in human meningiomas *Surg Neurol.* 31(3): 172-6.
- Warembourg M, Jolivet A, Milgrom E., 1989. Immunohistochemical evidence of the presence of estrogen and progesterone receptors in the same neurons of the guinea pig hypothalamus and preoptic area. *Brain Res.* 480(1-2):1-15.
- Wei LL, Leach MW, Miner RS, Demers LM., 1993. Evidence for progesterone receptors in human osteoblast-like cells. *Biochem Biophys Res Commun* 195:525-532.
- Weisz J. Ward I., 1980. Plasma testosterone and progesterone titers of pregnant rats, their male and female fetuses, and neonatal offspring. *Endocrinology* 106(1):306-16.
- Wen DX, Xu YF, Mais DE, Goldman ME, McDonnell DP., 1994. The A and B isoforms of the human progesterone receptor operate through distinct signaling pathways within target cells. *Mol Cell Biol.* 14(12):8356-64.
- Wong MSJ, Murphy LC., 1991. Differential regulation of c-myc by progestins and antiestrogens in T47-D human breast cancer cells. *J Steroid Biochem. Mol. Biol.* 39:39-44.
- Ylikomi T, Gasc JM, Isola J, Baulieu EE, Tuohimaa P., 1985. Progesterone receptor in the chick bursa of fabricius: characterization and immunohistochemical localization. *Endocrinology* 117(1):155-60.
- Zhang X, Jeyakumar M, Bagchi M., 1996. Ligand-dependent cross-talk between steroid and thyroid hormone receptor. *J. Biol. Chem.* 271(25):14825-14833.
- Zhang X, Jeyakumar M, Petukhov S, Bagchi MK., 1998. A nuclear receptor corepressor modulates transcriptional activity of antagonist-occupied steroid hormone receptor. *Mol. Endocrinol.* 12(4):513-24.

## 12. APÉNDICE

Datos de los pacientes

### ASTROCITOMAS.

No. DE TUMOR	EDAD/ SEXO	LOCALIZACION	EVOLUCION
1	30/F	Lóbulo Tempo- parietal	6 meses
2	37/F	Lóbulo Tempo- parietal	5 meses
3	55/F	Lóbulo Tempo- parietal	2 meses
4	26/M	Lóbulo Tempo- parietal	20 días
5	37/M	Lóbulo Tempo- parietal	5 días
6	62/M	Lóbulo Frontal	5 años
7	45/F	Fosa Temporal	6 meses
8	59/F	Lóbulo Frontal	1 año
9	25/M	Médula Espinal	3 meses
10	45/M	Lóbulo Frontal	1 año
11	47/M	Fosa Temporal	5 meses
12	48/M	Fosa Temporal	3 meses
13	73/M	Lóbulo Frontal	6 meses

### CORDOMAS

No. DE TUMOR	EDAD/ SEXO	LOCALIZACION	EVOLUCION
1	17/F	Petroclivar	6 meses
2	37/F	Esfenoides	1 año
3	38/F	Clivus	3 meses
4	40/F	Esfenoides	2 meses
5	56/F	Lóbulo Frontal	3 meses
6	56/M	Clivus	1 año

## II) REACTIVOS

□ **Oligo (dt)<sub>12-18</sub> Primer (Gibco BRL)**

25µg; 0.5µg/µl (STOCK)

□ **dNTPS (Gibco BRL)**

dATP (deoxiadenosina trifosfato) 100mM

dGTP (deoxiguanosina trifosfato) 100mM

dTTP (deoxitimosina trifosfato) 100 mM

dCTP (deoxicitosina trifosfato) 100 mM

□ **Transcriptasa Reversa M-MLV (Gibco BRL)**

Reversa transcriptasa del virus de leucemia murino de Moloney

200 U/µl

□ **Reactivo de TRIZOL (Gibco BRL)**

Tiocinato de guanidina

Fenol -cloroformo

ESTA TESIS NO PUEDE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

## III) SOLUCIONES

### A) Inmunohistoquímica

#### 1.-Solicitud de Poly-L-lisina.

Las laminillas se lavaron con alcohol al 90 % y se colocaron en una solución 1:10 de Poly-L-lisina durante 30 min, la cual permite la adhesión de los tejidos. Transcurrido el tiempo se sacudieron fuertemente y se colocaron en la estufa para secarlas durante 1h a 60°C.

## **2. PBS 1X**

Un litro de PBS 1X se preparó de la siguiente manera:

Solución A: 800 ml de una solución 10 mM de fosfato de sodio dibásico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1.13 g) y 150 mM de cloruro de sodio ( $\text{NaCl}$  7.01g), aforar y ajustar pH (pH 7.2-7.4) con la solución B.

Solución B: 200 ml de 10 mM de fosfato de sodio monobásico ( $\text{NaHPO}_4$ , 0.27g) y 150 mM de cloruro de sodio ( $\text{NaCl}$ , 1.75 g).

## **3. Cromógeno.**

Se preparó con 980  $\mu\text{l}$  de la solución-sustrato (Bufer de citratos-fosfatos y peróxido de hidrógeno) y 20  $\mu\text{l}$  de diaminobencidina de. Kit Universal Dako Lsab+peroxidasa esta solución se preparó 10 a 15 min antes de su aplicación.

## **4.Citrato de Sodio 10 mM, pH 6**

Pesar 2.28g de citrato de sodio y disolver en 800 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  y ajustar con ácido clorhídrico a pH 6 y aforar a un litro.

## **5.Amortiguador de carga para RNA 6X (Loading Buffer).**

50 % Glicerol.

1 mM EDTA (pH 8.0).

0.25 % azul de bromofenol

0.25% Xilen cianol.

## **6.-EDTA 0.5 M**

Agregar 186.1 g de EDTA (Etilendiaminotetra acetato) a 800 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada, agitar hasta que se disuelva. Ajustar el pH a 8.0, aforar a 1000 ml y esterilizar en autoclave.

### 7. H<sub>2</sub>O + DEPC

Disolver 1 ml de dietilpirocarbonato (DEPC) en 9 ml de alcohol etílico absoluto y aforar a 1000 ml con H<sub>2</sub>O destilada. Poner en baño de temperatura constante a 37° C por dos horas y esterilizar en autoclave

### 8. MOPS

0.1 M MOPS (ácido 3-[N-morfolino] propanesulfónico

40 mM de acetato de sodio

5 mM EDTA

Preparar con H<sub>2</sub>O+DEPC y esterilizar por filtración

### 9. TBE 10 X

0.5 M Tris base

0.5 M ácido bórico

10 mM EDTA

Para preparar TBE 5X 500ml

Tris base	27g
-----------	-----

Acido bórico	13.75g
--------------	--------

20.0 ml de EDTA 0.5 M	10 ml
-----------------------	-------

#### IV) GELES DE AGAROSA (1.1 %)

Condiciones desnaturalizantes.

Reactivo	Concentración Inicial	50 ml	120 ml	140 ml	180 ml
Agarosa	100%	0.55 g	1.32 g	1.54 g	1.98 g
MOPS	12X	4.16 ml	9.98 ml	11.64 ml	14.96 ml
Formaldehído	37 %	8.10 ml	19.44 ml	22.63 ml	29.09 ml
H2O+DEPC	0.1%	37.70 ml	90.48 ml	105.56 ml	135.00 ml

(2%) no desnaturalizantes

Reactivo	Concentración Inicial	50 ml	120 ml	140 ml	180 ml
Agarosa	100%	1 g	2.4 g	2.8 g	3.6 g
TBE	5 X	5 ml	12 ml	14 ml	18 ml

#### V) Anticuerpos

**\*Receptor a Progesterona Ab-3 N<sub>EO</sub>M<sub>ARKERS</sub> MS-193-P1 (100 µg)**

Anticuerpo monoclonal de ratón

Reconoce a dos proteínas una de 116 KDa y de 81 KDa, identificado como el sitio de unión de la hormona del RP humano en el C-terminal. Es una IgG<sub>1</sub> obtenida de carcinoma endometrial humano. Inmunoreactividad nuclear

**\*Receptor a Progesterona Ab-6 N<sub>EO</sub>M<sub>ARKERS</sub> MS-196-P1 (100 µg)**

Anticuerpo monoclonal de ratón

Reconoce solamente a una proteína de 116 KDa que detecta el N-terminal del RP-B. Es una IgG<sub>12b</sub> obtenida de carcinoma endometrial humano  
Inmunoreactividad nuclear.

17.7-00

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Laboratory Investigation

## Progesterone receptor isoforms expression pattern in human chordomas

Ignacio Camacho-Arroyo<sup>1</sup>, Gabriela González-Agüero<sup>1</sup>, Armando Gamboa-Domínguez<sup>2</sup>, Marco A. Cerbón<sup>1</sup> and Rodolfo Ondarza<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Biología, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México; <sup>2</sup>Departamento de Patología, Instituto Nacional de la Nutrición; <sup>3</sup>Departamento de Neurocirugía, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, México D.F., México

**Key words:** chordoma, progesterone receptors, estrogen receptors

### Summary

Steroid hormone receptors are involved in the regulation of tumor growth. Two progesterone receptor (PR) isoforms have been identified in humans: a larger form (PR-B) and the N-terminally truncated one (PR-A). PR isoforms can exert opposite functions and are differentially regulated by estrogens. PR have been detected in several brain tumors including chordomas, however, it is unknown which PR isoform is expressed in brain tumors. The aim of this study was to determine by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and by immunohistochemistry the expression pattern of PR isoforms in chordomas as well as its correlation with the expression of estrogen receptor  $\alpha$  (ER- $\alpha$ ). All studied chordomas expressed both PR and ER- $\alpha$ . PR-B was the predominant isoform in chordomas both at the mRNA and at the protein level. These data suggest that PR-B should be the predominant PR isoform expressed in human chordomas.

### Introduction

Chordomas are slow-growing, locally invasive, and potentially malignant tumors arising from intraosseous notochordal remnants. About 40% of these tumors originate in the clivus and are commonly seen in adults [1,2]. The complete extirpation of chordomas is almost impossible due to their location and extent. Local recurrence has been observed in a high percentage of cases [1]. There are very few data about the hormonal characterization of chordomas [3,4].

It has been reported that after proton beam irradiation therapy of chordomas women present a lesser survival time as compared to men and that postmenopausal patients have shortened survival times than premenopausal ones suggesting a relationship between sex steroid hormones and chordomas behavior [5,6].

Steroid hormones are involved in several physiological and pathological processes in the brain including the regulation of tumor cell growth [7-9]. Progesterone exerts many of its effects through the interaction with specific intracellular receptors (PR) [10,11]. These receptors are ligand-induced transcription factors that

regulate the expression of several genes by interacting with cognate DNA sequences called hormone-responsive elements [11,12].

Two PR (PR-A and PR-B) isoforms have been described in humans [13,14]. PR-A (94 kD) is a N-terminally truncated form of PR-B (114 kD). PR-A and PR-B are synthesized from the same gene and are generated from either alternative transcriptional or translational start sites [15,16]. PR isoforms are differentially expressed in various regions of the rat brain [17,18]. In the same cell PR isoforms can regulate different genes and exert distinct functions [19]. PR isoforms are differentially regulated by estradiol in several brain regions [17,20].

PR have been detected in several human brain tumors such as meningiomas, astrocytomas and craniopharyngiomas [21-24]. Two studies have demonstrated the presence of PR in chordomas, one case per study, by using binding techniques [25,26]; however, it is unknown which PR isoform is expressed in brain tumors. The aim of this study was to determine both at the mRNA and at the protein level the expression pattern of PR isoforms in chordomas, as well as its

Spare set - for your information only  
please retain.

correlation with the expression of estrogen receptor  $\alpha$  (ER- $\alpha$ ) which has not been detected in these brain tumors.

### Materials and methods

Six biopsies of chordomas from Mexican patients were analyzed. The patients signed a consent form of the National Institute of Neurology and Neurosurgery in order to allow the performance of the study. The location and the size of each tumor were obtained by computerized tomography. Biopsies were obtained by stereotactic procedures. Once they were excised, they were immediately preserved in  $N_2$  liquid until analysis.

#### *RNA isolation and RT-PCR*

Total RNA was isolated from each biopsy with the single-step method based on guanidine isothiocyanate/phenol/chloroform extraction using TRIzol reagent (Gibco-BRL, Inc) [27]. RNA concentration was determined by absorbance at 260nm, and its integrity was verified by electrophoresis on 1.1% denaturing agarose gels in the presence of 2.2M formaldehyde. Total RNA was reverse transcribed to synthesize single strand cDNA as previously described [20]. Ten  $\mu$ l of RT reaction were subjected to PCR in order to simultaneously amplify PR gene isoforms. The sequences of the specific primers unique for PR-B amplification segment (from +176 to +418) were 5'-[TGA CTG AGC TGA AGG CAA AG]-3' in the sense primer and 5'-[CGA CAG CGA CTG CTG GTC]-3' in the antisense one [28]. The primers used for common PR-A and PR-B amplification region (from +2677 to +2952) corresponding to the hormone binding domain were 5'-[GCT ACG AAG TCA AAC CCA GT]-3' in the sense and 5'-[CAC CAT CCC TGC CAA TAT C]-3' in the antisense [28]. The 50  $\mu$ l PCR reaction included: 10  $\mu$ l of synthesized cDNA, 20 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 1 mM  $MgCl_2$ , 0.2 mM of each dNTP, 0.5  $\mu$ M of each primer, and 2.5 units of Taq DNA polymerase. Human endometrium was used as a PR positive expression control. Negative controls without RNA and with non-retrotranscribed RNA were included in all the experiments.

After an initial denaturation step at 95°C for 5 min, PCR reaction was performed for 30 cycles. The cycle profile for PR isoforms amplification was: 95°C, 1 min; 60 C, 1 min; and 72 C, 1 min. A final extension cycle

was performed at 72 C for 5 min. The number of performed cycles was within the exponential phase of the amplification process. All PCR products were always studied and analyzed together throughout the experiments. Twenty-five  $\mu$ l of PCR products were separated on 2% agarose gel and stained with ethidium bromide. The image was captured under a UV transilluminator with a Type 665 negative film (Polaroid Co., Cambridge, MA).

#### *Immunohistochemistry*

Tissues were fixed in 4% paraformaldehyde in sodium phosphate buffer PBS (150 mM, pH 7.4) for 4 h at room temperature; then they were dehydrated and embedded in paraffin. Immunohistochemical detection of ER- $\alpha$  and PR isoforms was carried out by using the Universal Dako Lsab + peroxidase kit (Dako Corp., CA). Monoclonal antibodies used were ER Ab-10, PgR Ab-4 or PgR Ab-6 (Neo Markers, CA), which respectively recognize the ligand binding domain of ER- $\alpha$ , both PR isoforms, and just PR-B [29,30].

Serial sections of 6  $\mu$ m from each biopsy were mounted on slides coated with poly-L-lysine (Sigma, St. Louis, MO). They were deparaffinized and rehydrated through graded concentrations of alcohol to distilled water. Then the slides were transferred to sodium citrate buffer (10 mM, pH 6.0) and incubated in a microwave oven at 600 W for two cycles. Once the slides boiled, they were irradiated for 1 min more in each cycle. Slides were cooled between microwave irradiations for 5 min. They were washed twice with 50 mM PBS pH 7.4, and incubated successively with 3% hydrogen peroxide in PBS for 30 min at room temperature in a humid chamber; 0.0530 min 1% normal swine serum + 1% hydrogen peroxide in PBS for 30 min; ER Ab-10, PgR Ab-4 or PgR Ab-6 (4  $\mu$ g/ml) in PBS containing 0.3% triton X-100 and 1% gelatin for 24 h at 4°C. Sections were incubated with biotinylated secondary antibody for 45 min at room temperature and with conjugated streptavidin-peroxidase for 45 min. Sections were washed twice with PBS among incubations. Peroxidase activity was revealed with 3,3'-diaminobenzidine chromogen solution in the presence of hydrogen peroxide for 10 min. After washing with distilled water, sections were dehydrated and coverslipped with Canada Balsam without counterstaining. Immunohistochemical controls consisted of adjacent sections incubated with preimmune mouse serum instead of primary antibodies.



The number of immunoreactive cells and the staining intensity was counted in, at least, ten random fields/section at 400 $\times$  magnification. Immunoreactive cells were considered those with brown staining of the nucleus. The staining intensity was characterized as absent (-) less than 10% of stained cell nuclei; weak (+), moderate (++) or intense (+++) when 10–40%, 41–70% and 71–100% of cell nuclei were stained respectively.

## Results

We assessed PR isoforms gene expression in six biopses of human chordomas from five women and one man with a mean age of 40.6 years (range, 17–56 years) by using RT-PCR and immunohistochemistry (Table 1). In all PCR amplifications single bands of 273 and 242 bp corresponding to the expected size fragments of PR-A+B and PR-B were obtained (Figure 1). No bands were observed in the negative controls. The identity of each PCR product was confirmed by nucleotide sequencing and Southern blot analyses (data not shown). The results obtained by Southern blot were very similar to those observed in the analyzed films obtained from the gels stained with ethidium bromide. PR gene was expressed in all the studied chordomas (Table 1). Although both PR isoforms were expressed in chordomas, we observed that PR-B at the mRNA level was the predominant expressed isoform.

PR isoforms as well as ER- $\alpha$  expression was determined in chordomas at the protein level by immunohistochemistry. ER- $\alpha$  and PR isoforms immunoreactivity was localized in the nucleus of chordoma cells (Figure 2). A clear correlation between the number of

immunoreactive cells and the staining intensity was observed in all cases. Thus, tumors that presented the highest number of immunoreactive cells, also presented the most intense immunostaining. There was no difference in immunostaining between women and man biopses. ER- $\alpha$  and PR isoforms were detected in all chordomas (Table 1). As in the case of RT-PCR studies PR-B isoform was the predominant one in most tumors (4/6) since the number of immunoreactive cells detected with the antibody that only recognizes PR isoform was similar to that observed with the antibody that recognizes both PR isoforms (Table 1).

## Discussion

Our results demonstrate that PR isoforms as well as ER- $\alpha$  are expressed in human brain chordomas.

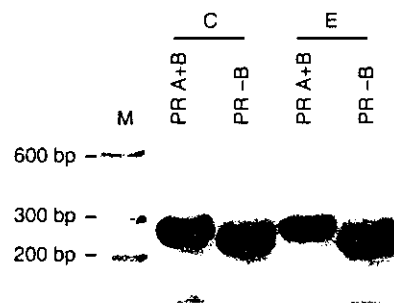
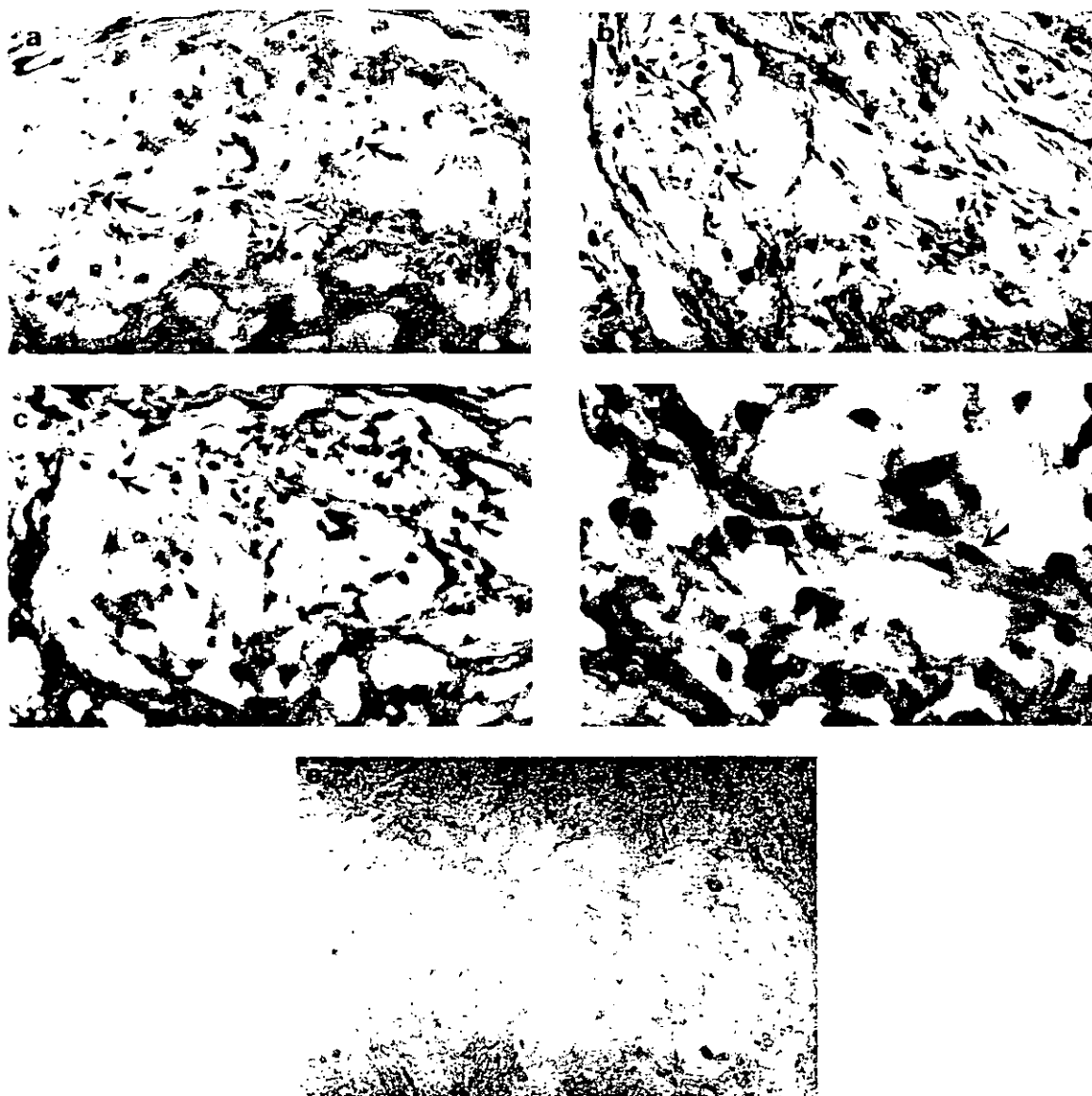


Figure 1. PR isoforms expression in chordomas. A representative assay of a simultaneous PR A+B and PR-B RT-PCR from total RNA of a human chordoma is shown. Human endometrium was used as a positive control. Molecular weight marker of 100 bp DNA ladder (M).

Table 1. Determination of PR isoforms and ER- $\alpha$  expression in human chordomas

Patient	Sex	Age (years)	Localization	PCR		Immunohistochemistry		
				PR A+B	PR-B	PR A+B	PR-B	ER- $\alpha$
1	F	17	PC	Positive	Positive	(+) 20	(+) 5	(++) 7
2	F	37	S	Positive	Positive	(+) 7	(+) 5	(++) 13
3	F	38	C	Positive	Positive	(++) 56	(++) 13	(++) 12
4	F	40	S	Positive	Positive	(+) 13	(+) 11	(++) 20
5	F	56	FL	Positive	Positive	(+++)	(+++)	(++) 35
6	M	56	C	Positive	Positive	(+) 18	(+) 18	(++) 20

In the case of RT-PCR studies we amplified fragments of PR A+B, PR-B and GAPDH using total RNA isolated from chordomas. PR isoforms and ER- $\alpha$  expression was determined in chordomas at the protein level by immunohistochemistry. Data indicate both the number of immunoreactive cells detected with the antibodies that recognize both PR isoforms (PR A+B), PR-B and ER- $\alpha$  and the intensity of the immunoreaction (+) weak, (++) moderate, (+++) intense. (PC) petroclivar, (S) sphenoid, (FL) frontal lobe. (C) clivus.



*Figure 2.* Immunohistochemical determination of sex steroid hormone receptors in a chordoma. A chordoma biopsy was incubated with monoclonal antibodies that respectively recognize ER- $\alpha$  (a), both PR isoforms (PR-AB) (b), and PR-B (c,d). A negative control incubated with a mouse preimmune serum is shown (e). Arrows show immunoreactive nuclei. (a–c,e): 400 $\times$ ; (d): 1000 $\times$ .

We confirmed and extended the information about the presence of sex steroid hormone receptors in chordomas [25,26]. We found that the predominant PR isoform expressed in chordomas was PR-B.

All chordomas expressed both PR isoforms but PR-B expression was higher than that of PR-A as assessed by

RT-PCR and immunohistochemistry. The similarity of PR isoforms expression pattern both at the mRNA and at the protein level suggests that PR expression in chordomas should be regulated at the transcriptional level.

The importance of knowing which PR isoform is expressed in human brain tumors is due to the fact

that progesterone can exert different functions in a cell, depending on the expression pattern of PR isoforms [13,14,19]. The activation of PR-B, but not that of PR-A, in breast cancer cell lines induces the expression of flavin-containing monooxygenase which is involved in the activation of drugs to carcinogenic intermediates [31]. Moreover, the activation of over-expressed PR-A in breast cancer cell lines markedly modifies both the expression of PR-regulated genes and the morphology of these cells [32]. These changes have been associated to a metastatic state of breast cells. Thus, the activation of PR-A or PR-B may exert different effects on tumor progression and metastasis. We suggest that the hormonal approach to the treatment of brain tumors should include the determination of the expression pattern of steroid hormone receptor isoforms. According to our data PR-B is the isoform mainly involved in the putative effects of progesterone in chordomas.

An inverse relationship has been found between the malignancy of other brain tumors such as meningiomas and the presence of PR. In many cases malignant meningiomas lack PR whereas benign ones possess these steroid receptors [33]. Indeed, PR expression in meningiomas is considered to be a favorable prognostic factor [34]. At the moment this relationship cannot be established in chordomas since it is not known the role of sex steroid hormones in chordomas growth.

In contrast to the higher incidence of meningiomas in women [35], there is not a gender difference in chordomas incidence or during specific hormonal states when progesterone levels are very high such as in pregnancy as it also occurs in meningiomas [36], however, it has been suggested that steroid hormone receptor status should be one of the factors involved in the significantly lesser survival time in women as compared to men after proton beam irradiation therapy of chordomas [5,6]. Interestingly, it was shown that postmenopausal patients have shortened survival times than premenopausal ones, suggesting that changes in hormonal milieu that occur at menopause may contribute to the poor outcome [6].

We also demonstrated ER- $\alpha$  expression in human chordomas. To our knowledge, this is the first time that ER- $\alpha$  is detected in chordomas. In contrast with other brain tumors such as meningiomas and gliomas where ER expression is controversial or not expressed in all the analyzed tumors [22,37,38], we found that all studied chordomas consistently express ER- $\alpha$ . This

suggests a functional role of estrogens in chordomas growth, but this deserves further investigation.

Although the finding that ER- $\alpha$  was co-expressed with PR suggests that the latter should be regulated by estrogens, we cannot rule out the possibility that PR isoforms expression be estrogen-independent in chordomas since in other brain tumors such as meningiomas and astrocytomas PR expression is independent of that of ER- $\alpha$  [38,39]. Therefore, PR isoforms regulation by estrogens in chordomas deserves further research.

In conclusion, our data indicate that PR-B is the predominant expressed isoform in human chordomas and that these brain tumors express ER- $\alpha$ .

#### Acknowledgements

This work was supported by El Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Project No. 2115-PM), México. We thank Flora García-Formentí (CELE, Universidad Nacional Autónoma de México) for revision of the English.

#### References

1. Burger PC, Scheithauer BW, Vogel FS: *Surgical Pathology of the Nervous System and its Coverings*. Churchill Livingstone Inc., New York, 1991, pp 34–39
2. Poirer J, Gray F, Escourolle R: *Manual of Basic Neuropathology*. W.B. Saunders Co., Philadelphia, 1990, pp 17–56
3. van Groenrighen JC, Kiesel L, Winkler D, Zwimer M: Effects of luteinising-hormone-releasing hormone on nervous system tumours. *Lancet* 352: 372–373, 1998
4. Arita-Melzer O, Medina H, Borsotto G, Gamboa A, Larriva-Sahd J, Trejo G, Cardenas S, Aguilar-Salinas CA, Rull JA, Gómez-Pérez FJ: An ectopic adrenocorticotrophic hormone syndrome caused by a sacrococcygeal chordoma: report of a case with a slow progression. *Endocr Pract* 4: 37–40, 1998
5. Austin-Seymour M, Munzenrider J, Goitein M, Verhey L, Urie M, Gentry R, Birnbaum S, Ruotolo D, McManus P, Skates S, Ojemann RG, Rosenberg A, Schiller A, Koehler A, Suit HD: Fractionated proton radiation therapy of chordoma and low-grade chondrosarcoma of the base of the skull. *J Neurosurg* 70: 13–17, 1989
6. O'Connell JX, Renard LG, Liebsch NJ, Efrid JT, Munzenrider JE, Rosenberg AE: Base of skull chordoma. *Cancer* 74: 2261–2267, 1994
7. Camacho-Arroyo I, Pasapera AM, Pérez-Palacios G, Cerbón MA: Progesterone and its metabolites in the function of the central nervous system. *Rev Invest Clin* 47: 329–340, 1995

8. Schrell UMH, Adams EF, Fahlbusch R, Greh R, Jirkowski G, Prior R, Ramalho-Ortigao FJ: Hormonal dependency of cerebral meningiomas. Part I: Female sex receptors and their significance as specific markers for adjuvant medical therapy. *J Neurosurg* 73: 743-749, 1990
9. Grunberg SM, Weiss MH, Spitz IM, Ahmadi J, Sadun A, Russell CA, Lucci L, Stevenson LL: Treatment of unresectable meningiomas with the antiprogesterone agent mifepristone. *J Neurosurg* 74: 861-866, 1991
10. Graham JD, Clarke CL: Physiological action of progesterone in target tissues. *Endocr Rev* 18: 502-519, 1997
11. Gronemeyer H: Transcription activation by estrogen and progesterone receptors. *Annu Rev Genet* 25: 89-123, 1991
12. Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schutz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Manuel M, Chambon P, Evans RM: The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 83: 835-839, 1995
13. McDonnell DP: Unraveling the human progesterone receptor signal transduction pathway. *Trends Endocrinol Metab* 6: 133-138, 1995
14. Grandjean PH, McDonnell DP: The A and B isoforms of the human progesterone receptor: two functionally different transcription factors encoded by a single gene. *Rec Progr Horm Res* 54: 291-314, 1999
15. Conneely OM, Maxwell BL, Toft DO, Schrader WT, O'Malley BW: The A and B forms of the chicken progesterone receptor arises by alternate initiation of translation of a unique mRNA. *Biochem Biophys Res Commun* 149: 493-501, 1987
16. Kastner P, Krust A, Turcotte B, Stropp U, Tora L, Gronemeyer H, Chambon P: Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding two functionally different human progesterone receptors forms A and B. *EMBO J* 9: 1603-1614, 1990
17. Camacho-Arroyo I, Guerra-Araiza C, Cerbón MA: Progesterone receptor isoforms are differentially regulated by sex steroids in the rat forebrain. *Neuroreport* 9: 3993-3996, 1998
18. Kato J, Hirata S, Nozawa A, Mouri N: The ontogeny of gene expression of progesterone receptors in the female rat brain. *J Steroid Biochem Molec Biol* 47: 173-182, 1993
19. Tora L, Gronemeyer H, Turcotte B, Gaub MP, Chambon P: The N-terminal region of the chicken progesterone receptor specifies target gene activation. *Nature* 333: 185-188, 1988
20. Guerra-Araiza C, Cerbón MA, Morimoto S, Camacho-Arroyo I: Progesterone receptor isoforms expression pattern in the rat brain during the estrous cycle. *Life Sci* 66: 1743-1752, 2000
21. Bozzetti C, Camisa R, Nizzoli R, Manotti L, Guazzi A, Naldi N, Mazza S, Nizzoli V, Cocconi G: Estrogen and progesterone receptors in human meningiomas: Biochemical and immunocytochemical evaluation. *Surg Neurol* 43: 230-234, 1995
22. Carroll RS, Zhang J, Dashner K, Sar M, Black PM: Steroid hormone receptors in astrocytic neoplasms. *Neurosurgery* 37: 496-504, 1995
23. Honnegger J, Renner C, Fahlbusch R, Adams EF: Progesterone receptor gene expression in craniopharyngiomas and evidence for biological activity. *Neurosurgery* 41: 1359-1364, 1997
24. Poisson M, Pertuiset BF, Hauw JJ, Philippon J, Buge A, Moguilewsky M, Philibert D: Steroid hormone receptors in human meningiomas, gliomas and brain metastases. *J Neuro-Oncol* 1: 179-189, 1983
25. Stojkovic RR, Jovancevic M, Santel DJ, Greecic N, Gamulin S: Sex steroid receptors in intracranial tumors. *Cancer* 65: 1968-1970, 1989
26. Martinez R, Marcos ML, Figueras A, Vaquero J: Estrogen and progesterone receptors in intracranial tumors. *Clin Neuropharmacol* 7: 338-342, 1984
27. Chomczynski P, Sacchi N: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extractions. *Anal Biochem* 162: 156-159, 1987
28. Misrahi M, Atger M, d'Auriol L, Loosfelt H, Meriel C, Fridlanski F, Guiochon-Mantel A, Galibert F, Milgrom E: Complete nucleotide sequence of the human progesterone receptor deduced from cloned cDNA. *Biochem Biophys Res Commun* 143: 740-748, 1987
29. Abbondanza C, de Falco A, Nigro V, Medici N, Armetta I, Molinari AM, Moncharmont B, Puca GA: Characterization and epitope mapping of a new panel of monoclonal antibodies to estradiol receptor. *Steroids* 58: 4-12, 1993
30. Clarke CL, Zaino RJ, Feil PD, Miller JV, Steck ME, Ohlsson-Wilhelm BM, Satyaswaroop PG: Monoclonal antibodies to human progesterone receptor: characterization by biochemical and immunohistochemical techniques. *Endocrinology* 121: 1123-1132, 1987
31. Miller MM, James RA, Richer JK, Gordon DF, Wood WM, Horwitz KB: Progesterone regulated expression of flavin-containing monooxygenase 5 by the B-isoform of progesterone receptors: implications for tamoxifen carcinogenicity. *J Clin Endocrinol Metab* 82: 2956-2961, 1997
32. McGowan EM, Clarke CL: Effect of overexpression of progesterone receptor A on endogenous progesterone-sensitive endpoints in breast cancer cells. *Mol Endocrinol* 13: 1657-1671, 1999
33. Brandis A, Mirzai S, Tatagiba M, Walter GF, Samii M, Ostertag H: Immunohistochemical detection of female sex hormone receptors in meningiomas: correlation with clinical and histological features. *Neurosurgery* 33: 212-218, 1993
34. Hsu DW, Efrid JT, Hedley-Whyte ET: Progesterone and estrogen receptors in meningiomas: Prognostic considerations. *J Neurosurg* 86: 113-120, 1997
35. Magrassi L, Butti G, Silini E, Bono F, Paoletti P, Milanese G: The expression of genes of the steroid-thyroid hormone receptor superfamily in central nervous system tumors. *Anticancer Res* 13: 859-866, 1993
36. Isla A, Alvarez F, Gonzalez A, Garcia-Grande A, Perez-Alvarez M, Garcia-Blazquez M: Brain tumor and pregnancy. *Obstet Gynecol* 89: 19-23, 1997
37. Carroll RS, Zhang J, Black PM: Expression of estrogen receptors alpha and beta in human meningiomas. *J Neuro-Oncol* 42: 109-116, 1999

38. Assimakopoulou M, Sotriopoulou-Bonikou G, Maraziotis T, Varakis J: Does sex steroid receptor status have any prognostic or predictive significance in brain astrocytic tumors? *Clin Neuropathol* 17: 27-34, 1998
39. Blankenstein MA, Koehorst SGA, van der Kallen CJH, Jacobs HM, van Spriel AB, Donker GH, van't Verlaat JW, Blaauw G, Thijssen JHH: Oestrogen receptor independent expression of progesterin receptors in human

meningioma - a review *J Steroid Biochem Molec Biol* 53: 361-365, 1995

*Address for offprints:* Dr. Ignacio Camacho-Arroyo, Departamento de Biología, Facultad de Química, Ciudad Universitaria, Coyoacán 04510, México D.F., Mexico; Tel.: (525) 622-30-98; Fax: (525) 616-20-10; E-mail: igear@servidor.unam.mx