



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE QUÍMICA

EFFECTOS DE LA PROGESTERONA Y EL RU486 SOBRE  
LA PROGRESIÓN DE ASTROCITOMAS HUMANOS  
GRADO III EN UN MODELO *IN VIVO*

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A :

LILIANA GERMÁN CASTELÁN



MÉXICO, D.F.

2012



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.

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE: DR. IGNACIO CAMACHO ARROYO**

**VOCAL: DRA. LIDYA SUMIKO MORIMOTO MARTÍNEZ**

**SECRETARIO: DRA. ALIESHA ARACELI GONZÁLEZ ARENAS**

**1er. SUPLENTE: M. EN C. OLIVIA TANIA HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ**

**2° SUPLENTE: DRA. CAROLINA ÁLVAREZ DELGADO**

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: LABORATORIO 107 EDIFICIO "F",  
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.**

**ASESOR DEL TEMA: DR. IGNACIO CAMACHO ARROYO**

---

**SUPERVISOR TÉCNICO: DR. JOAQUÍN MANJARREZ MARMOLEJO**

---

**SUSTENTANTE: LILIANA GERMÁN CASTELÁN**

---

## **Agradecimientos**

A la DGAPA, UNAM (Proyecto PAPIIT: IN212611) por brindar el apoyo económico que permitió la realización de la presente tesis bajo la dirección del Dr. Ignacio Camacho Arroyo en el Departamento de Biología de la Facultad de Química.

A la Dra. Aliesha González Arenas por el apoyo técnico durante el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Ignacio Camacho, la Dra. Sumiko Morimoto y la Dra. Aliesha González por su interés al revisar y comentar esta tesis.

A mis padres.

Por su amor y dedicación. Por enseñarme que el esfuerzo siempre tiene una recompensa. Por ser mi ejemplo a seguir y mi mayor orgullo.

A mis hermanos.

Porque ustedes siempre han estado ahí. Por los momentos de risas, ocio, juegos y confidencias. Porque tienen la capacidad innata de desesperarme. Y porque gracias a ustedes soy un poquito más normal.

Al Dr. Ignacio Camacho, por abrirme las puertas de su laboratorio y dejarme explorar el bello mundo de la investigación. Por ser un gran tutor y animarme a tomar nuevos retos. Por su paciencia y su buen humor.

A la Dra. Aliesha González. ¡Draaaaaaaa! Por todo lo que me has enseñado. Por estar siempre dispuesta a ayudar. Por tus consejos. Por guiarme. Por las charlas y las risas. Porque más que una maestra has llegado a ser una amiga.

Al Dr. Joaquín Manjarrez. Por recibirme aunque viniera de un laboratorio extraño. Por toda la ayuda y el trabajo que se aventó en este proyecto. Por las explicaciones y las enseñanzas.

A todos los chicos del lab 107: CoValencia, Mique, Gaby Tibolona, Tania petit, Tania mamá, Pau, Moni, Caro, Brenda y aunque ya no estén ahí, los extrañamos y muy seguido nos acordamos de Wroomis y Grace. Por hacer que el 107 sea el mejor labo. Por la comida. Por las pláticas. Por hacer que trabajar sea tan divertido. Por su apoyo y ayuda siempre que me ven sufriendo (¡aaaaah!). Por las mordidas. Por sus consejos.

A los maletas: Harry, Dianananananana, Sergio Ignacio, Criiistina Inés, Dany, Sandra María de la Sagrada Constitución, Gus, Felipe. Por ser siempre tan maletas. Por hacer de esta experiencia algo maravilloso. Por acompañarme. Por su apoyo. Por los momentos.

A Juani. Porque a pesar del tiempo sigues aquí.

*La única manera de descubrir los límites de lo posible es aventurarse un poco más allá, hacia lo imposible.*

Arthur C. Clark

## ÍNDICE

<b>1. Abreviaturas</b> .....	1
<b>2. Resumen</b> .....	2
<b>3. Introducción</b> .....	3
<b>4. Antecedentes</b> .....	4
4.1. Progesterona.....	4
4.1.1. Estructura y función de la progesterona.....	4
4.1.2. Mecanismo de acción.....	7
4.2. Receptores intracelulares a progesterona.....	9
4.2.1. Características.....	9
4.2.2. Isoformas.....	10
4.3. Antagonistas de la progesterona.....	11
4.3.1. Generalidades.....	11
4.3.2. Características del RU486.....	13
4.4. Tumores cerebrales.....	14
4.4.1. Astrocitomas.....	14
4.5. Progesterona y astrocitomas.....	16
<b>5. Planteamiento del problema</b> .....	19
<b>6. Hipótesis</b> .....	19
<b>7. Objetivos</b> .....	20
7.1. Objetivo general.....	20
7.2. Objetivos particulares.....	20
<b>8. Metodología</b> .....	21
8.1. Cultivo celular.....	21
8.2. Implante de células tumorales en el cerebro de la rata.....	21
8.3. Tratamientos.....	22
8.4. Pruebas motoras.....	22
8.5. Análisis histológico.....	23
8.6. Análisis estadístico.....	25
<b>9. Resultados</b> .....	26
<b>10. Discusión</b> .....	33
<b>11. Conclusiones</b> .....	36
<b>12. Referencias</b> .....	37

## 1. ABREVIATURAS

<b>3<math>\alpha</math>-HSOR</b>	3 $\alpha$ -hidroxiesteroide oxidorreductasa
<b>3<math>\beta</math>-HSD</b>	3 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa
<b>5<math>\alpha</math>-DPH</b>	5 $\alpha$ -dihidroprogesterona
<b>AKRs</b>	Aldo-ceto reductasas
<b>AMPC</b>	Monofosfato cíclico de adenosina
<b>Bcl-2</b>	Proteína reguladora de apoptosis derivada de linfoma de células B – 2
<b>DBD</b>	Dominio de unión al ADN
<b>EGF</b>	Factor de crecimiento epidérmico
<b>EGFR</b>	Receptor de factor de crecimiento epidérmico
<b>ERP</b>	Elemento de respuesta a progesterona
<b>FSH</b>	Hormona folículo estimulante
<b>GABA</b>	Ácido $\gamma$ -aminobutírico
<b>HSE</b>	Hidroxiesteroide epimerasa
<b>HSP</b>	Proteína de choque térmico
<b>LH</b>	Hormona luteinizante
<b>LBD</b>	Dominio de unión a ligando
<b>P450scc</b>	Enzima de escisión de la cadena lateral del colesterol
<b>PDGF</b>	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
<b>PRL</b>	Prolactina
<b>RP</b>	Receptor a progesterona
<b>SDRs</b>	Deshidrogenasas/reductasas de cadena corta
<b>SRC</b>	Coactivador de receptores a hormonas estroides
<b>TGF-<math>\alpha</math></b>	Factor de crecimiento tumoral $\alpha$
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Factor de crecimiento transformante $\beta$
<b>VEGF</b>	Factor de crecimiento endotelial vascular

## 2. RESUMEN

La progesterona ( $P_4$ ) es una hormona esteroide secretada principalmente por los ovarios. Sus órganos blanco principales son el útero, la glándula mamaria y el cerebro, y aunque realiza sus efectos a través de diversos mecanismos, la mayoría son mediados a través de la unión con su receptor intracelular, el receptor a progesterona (RP).

Esta hormona participa en diversos procesos reproductivos tales como la ovulación y la conducta sexual, además de estar involucrada en procesos no reproductivos como el aprendizaje y la neuroprotección y en procesos patológicos como el cáncer.

Se han realizado estudios *in vitro* donde se reporta que en las líneas celulares U373 y D54 derivadas de astrocitomas humanos grado III y grado IV respectivamente, la  $P_4$  induce proliferación celular y que este efecto es bloqueado por el antagonista RU486, sin embargo, se desconoce la participación de la  $P_4$  y el RU486 en el crecimiento de células derivadas de astrocitomas humanos en modelos *in vivo*, por lo cual en este trabajo se estudió el efecto de dichos compuestos sobre el crecimiento e infiltración de las células U373 implantadas en la corteza cerebral de la rata, a través de un análisis histológico y pruebas motoras.

La administración de  $P_4$  en nuestro modelo favoreció el crecimiento del tumor así como la infiltración de las células U373 implantadas en la corteza cerebral de la rata, mientras que el RU486 bloqueó el efecto producido por la  $P_4$ , por lo cual se sugiere que el mecanismo de acción de la proliferación e infiltración celular provocado por la  $P_4$  es mediado por la interacción con el RP.

No se observaron diferencias significativas en el desempeño motor de las ratas asociado a la progresión del tumor bajo ninguno de los esquemas de tratamiento.

Estos resultados sugieren que la  $P_4$  a través de la interacción con el RP induce el crecimiento e infiltración de los astrocitomas en un modelo *in vivo* sin afectar el desempeño motriz.

### 3. INTRODUCCIÓN

Los gliomas son un grupo de tumores derivados de las células gliales (astrocitos, oligodendrocitos y células ependimales) que se denominan astrocitomas, oligodendrogliomas y ependimomas respectivamente, y representan más del 50% del total de tumores del Sistema Nervioso Central (SNC), registrándose aproximadamente 6.5 casos por cada 100,000 personas por año. Los astrocitomas representan el 40% del total de tumores del SNC y hasta el 70% de los gliomas. Dentro de ellos, el astrocitoma anaplásico (grado III según la clasificación de la OMS) (Louis et al., 2007) y el glioblastoma multiforme (grado IV), son los más frecuentes y de mayor malignidad en la población mundial. El pronóstico depende de múltiples factores como son el grado de malignidad, la localización, el tamaño y el tiempo de evolución, sin embargo, presentan una baja tasa de recuperación por lo cual el tiempo de supervivencia en general, es muy corto. Los tratamientos como la neurocirugía y la radioterapia no dan resultado en una alta proporción de pacientes e incluso la quimioterapia es poco exitosa logrando una modesta prolongación de la supervivencia (Osoba et al., 2000).

Se han encontrado diversos factores asociados con el desarrollo y evolución en el grado de malignidad de los astrocitomas (Sarkar et al., 2009). Existen informes que sugieren que las hormonas sexuales, entre las que se encuentra la progesterona ( $P_4$ ), pueden participar en el crecimiento de los tumores cerebrales (Camacho-Arroyo et al., 2000; González-Agüero et al., 2001, 2007; Cabrera-Muñoz et al., 2011) a través de la interacción con su receptor intracelular (RP) y que la administración de su antagonista, el RU486 bloquea los efectos de la  $P_4$  (González-Agüero et al., 2007; Cabrera-Muñoz et al., 2009, 2011; Ramaswamy et al., 2012).

Se han realizado distintos trabajos *in vitro* sobre los efectos de las hormonas sexuales en líneas celulares derivadas de astrocitomas humanos, sin embargo, no se han realizado estudios en modelos *in vivo*, por lo cual en el presente trabajo se estudió el efecto de la  $P_4$  y del RU486 sobre el crecimiento e infiltración tumoral en ratas implantadas con células U373 derivadas de astrocitomas humanos grado III en la corteza cerebral.

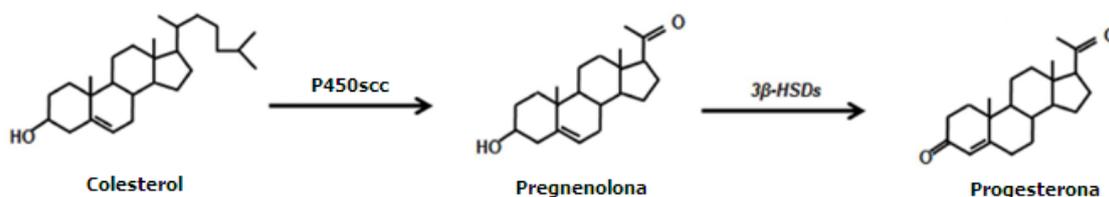
## 4. ANTECEDENTES

### 4.1. Progesterona

#### 4.1.1. Estructura y función de la progesterona

La P<sub>4</sub> (4-pregnen-3,20-diona) es una hormona esteroide de 21 átomos de carbono derivada del colesterol. Es sintetizada en las células del cuerpo lúteo, la corteza adrenal, la placenta y en neuronas y células gliales del SNC (Graham and Clarke, 1997; Schumacher et al., 2012). Su síntesis comienza con la conversión de colesterol en pregnenolona por el citocromo P450<sub>scc</sub>, localizado en la membrana interna de la mitocondria. Posteriormente la pregnenolona se transporta al retículo endoplásmico liso donde es convertida a P<sub>4</sub> por la 3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa (3β-HSD) (Schumacher et al., 2012) (Fig. 1).

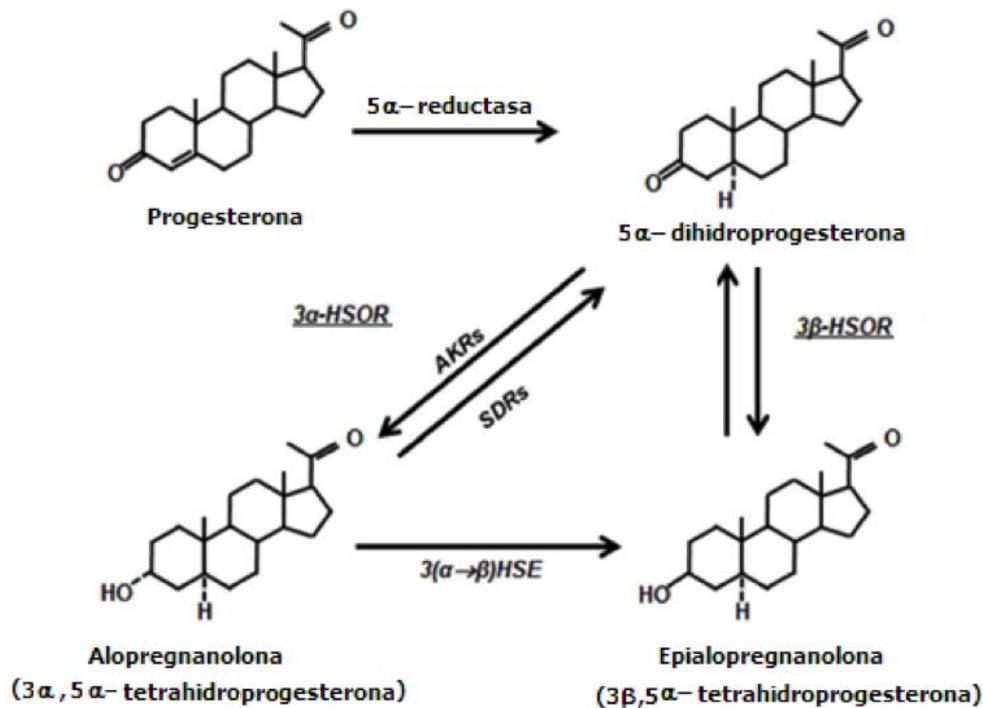
La síntesis y secreción de la P<sub>4</sub> se encuentra regulada por diversas hormonas, entre las que se encuentran la hormona luteinizante (LH), la hormona folículo estimulante (FSH), la prolactina (PRL), prostaglandinas y agentes β adrenérgicos (Graham and Clarke, 1997).



**Figura 1.** Biosíntesis de la P<sub>4</sub>. El colesterol es convertido en pregnenolona en una reacción catalizada por el citocromo P450<sub>scc</sub>, en la que pierde un fragmento de 6 átomos de carbono de su cadena lateral. La pregnenolona se convierte en P<sub>4</sub> después de la oxidación del grupo alcohol en C-3 y del movimiento del doble enlace de C-5 hacia C-4, mediante la enzima 3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa (3β-HSD) [Modificado de Schumacher et al., 2012].

La P<sub>4</sub> es metabolizada a 5α-dihidroprogesterona (5α-DPH), la cual puede transformarse en alopregnanolona o en epialopregnanolona (Fig. 2). Estos metabolitos tienen actividad biológica, siendo la alopregnanolona un modulador

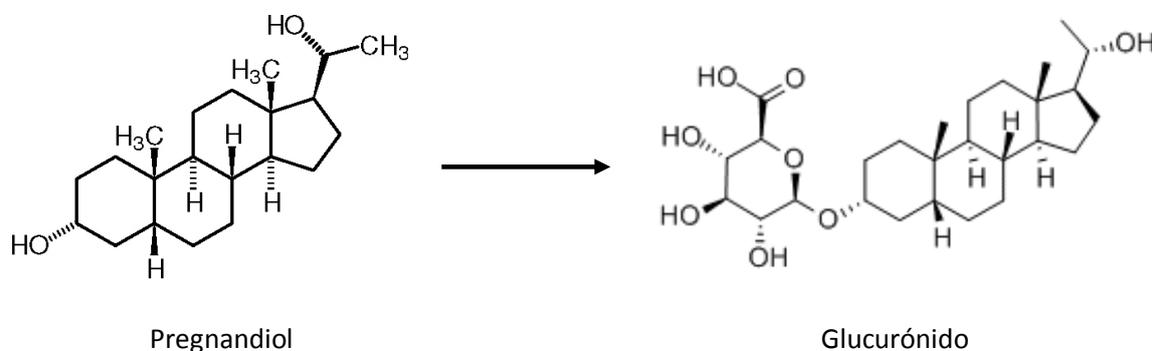
alostérico positivo de los receptores GABA<sub>A</sub> en el cerebro, mientras que la epialopregnanolona presenta un efecto inhibitorio sobre los mismos (Schumacher et al., 2012).



**Figura 2.** Metabolismo de la P<sub>4</sub>. La conversión de P<sub>4</sub> a 5α-dihidroprogesterona (5α-DPH) es catalizada por dos isoformas de la enzima 5α-reductasa. La 5α-DPH puede ser metabolizada a alopregnanolona por la 3α-hidroxiesteroide oxidorreductasa (3α-HSOR), involucrando a Aldo-ceto reductasas (AKRs) para la conversión a alopregnanolona, y deshidrogenasas/reductasas de cadena corta (SDRs) para regresar de ésta a la 5α-DPH, la cual también puede convertirse en epialopregnanolona mediante la 3β-hidroxiesteroide reductasa (3β-HSOR). La 3(α→β)hidroxiesteroide epimerasa (HSE) cataliza la epimerización de alopregnanolona en epialopregnanolona [Tomado de Schumacher et al., 2012].

Aproximadamente el 2% de la P<sub>4</sub> circula de manera libre en el torrente sanguíneo, en tanto que el 80% está unida a la albúmina y el 18% a la globulina fijadora de corticosteroides (Graham and Clarke, 1997; Ganong, 2006). La P<sub>4</sub> tiene una vida media de 36.5 horas (Miller et al., 1999) y en el hígado se convierte a pregnandiol el cual permite la conjugación para formar

glucurónidos, que al ser de carácter hidrofílico facilitan su excreción por la orina (Ganong, 2006) (Fig. 3).



**Figura 3.** Conjugación del pregnandiol con ácido glucurónico, formando un conjugado glucurónico.

La P<sub>4</sub> participa en un amplio rango de funciones biológicas en diferentes tejidos, como ejemplo de ellas se encuentra la liberación e implantación del óvulo fecundado, el mantenimiento del embarazo y el desarrollo de la glándula mamaria. En el cerebro regula la conducta sexual, reduce la excitabilidad neuronal, aumenta el sueño y presenta efectos neuroprotectores. También participa en la ventilación pulmonar, el crecimiento y la diferenciación celular (Suzuki et al., 1994; Camacho-Arroyo et al., 1995; Graham and Clarke, 1997; González-Arenas et al., 2003).

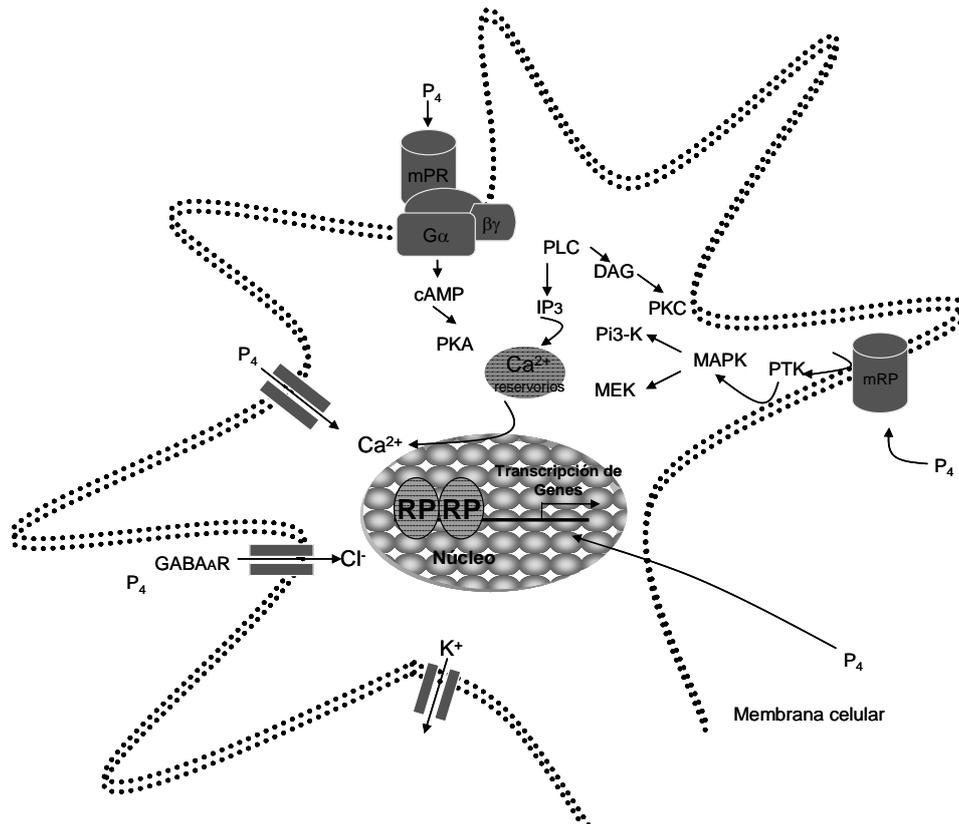
Otro de los efectos estudiados de la P<sub>4</sub> es su participación en el ciclo celular y particularmente, la entrada en la fase S. Para ello se han utilizado como modelo células de cáncer de mama T47-D en cultivo, las cuales expresan el RP. Cuando estas células se tratan con P<sub>4</sub> se observa aumento en la progresión del ciclo celular, lo que está relacionado con la inducción de la expresión de genes asociados a este proceso, como la ciclina CD-1 (Musgrove et al., 1991, 1993), los factores de crecimiento EGF, TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  (Murphy et al., 1988; Musgrove et al., 1991) y los protooncogenes asociados con la actividad proliferativa c-myc y c-fos (Wong and Murphy, 1991; Musgrove et al., 1991). Este efecto puede ser bloqueado por el antagonista de la P<sub>4</sub> el RU486 (Skildum et al., 2005).

#### 4.1.2. Mecanismo de acción

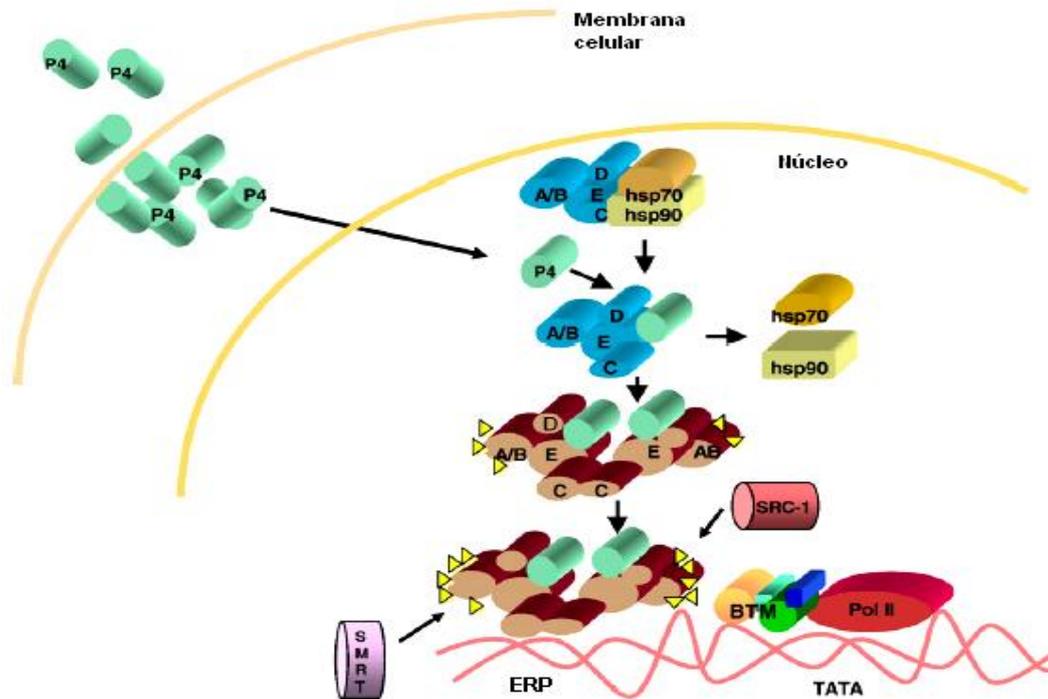
La  $P_4$  actúa en sus células blanco a través de dos mecanismos principales denominados genómico y no genómico. El primero involucra la interacción de la  $P_4$  con su receptor intracelular, el RP, mientras que el segundo requiere la interacción de la  $P_4$  con canales iónicos y receptores membranales (Burger et al., 1999), lo cual modifica la conductancia de iones (Blackmore, 1993), induce la formación de segundos mensajeros como el AMPc, así como la fosforilación de proteínas, interacción con receptores membranales específicos e interacción con receptores a neurotransmisores como el  $GABA_A$  (Camacho-Arroyo et al., 2007) (Fig. 4).

La vía genómica es la más estudiada, en ésta la  $P_4$  interactúa con el RP el cual se dimeriza y se une con elementos de respuesta a  $P_4$  (ERP) ubicados en los promotores de los genes blanco (Camacho-Arroyo et al., 2003). El mecanismo en general consiste en que la  $P_4$  atraviesa la membrana celular por difusión simple, ya que tiene carácter lipofílico, y en el núcleo o en el citoplasma se une a su receptor, la unión provoca un cambio estructural en el receptor que le permite disociarse de las proteínas de choque térmico (Hsp70, 90 y 56), lo que expone la región que le permite fosforilarse y dimerizarse, resultando en una estructura con alta afinidad a secuencias específicas en el DNA (ERP). Una vez unido al ERP, el complejo ligando-receptor facilita el ensamblaje y la estabilización del complejo de pre-iniciación de la transcripción en los promotores de genes blanco de  $P_4$  como el VEGF y EGFR (Camacho-Arroyo and Rodríguez-Dorantes, 2006) (Fig. 5).

Se ha observado que el RP interactúa con corre reguladores que pueden modificar la estructura de la cromatina y favorecer de manera indirecta la interacción del receptor con los factores generales de transcripción. El complejo formado puede reclutar otros corre reguladores como los coactivadores de receptores a hormonas esteroideas (SRC), los cuales facilitan el proceso de transcripción mediante cambios en el patrón de acetilación de las histonas (Prieto et al., 2003; Hernández-Hernández et al., 2010).



**Figura 4.** Esquema de los mecanismos de acción de la P<sub>4</sub>. Los efectos de la P<sub>4</sub> ocurren por dos diferentes mecanismos celulares: 1.- no genómico, que incluye receptores membranales y canales iónicos, cuya activación inicia cascadas de señalización mediante la intervención de mensajeros intracelulares. mRP (o mPR): Receptor membranar a P<sub>4</sub>, G: Proteína G, αβγ: Subunidades de la proteína G, cAMP: Adenosín monofosfato cíclico, PKA: Proteína Cinasa A, GABA<sub>A</sub>R: Receptor a GABA tipo A, Ca<sup>2+</sup>: Calcio, Cl<sup>-</sup>: Cloro, K<sup>+</sup>: Potasio, PTK: Proteína Tirosina Cinasa, MAPK: Proteína Cinasa Activada por Mitógenos, MEK: Cinasa de MAPK, PI3-K: Cinasa de Inositol Trifosfato, PLC: Fosfolipasa C, DAG: Diacil glicerol, PKC: Proteína Cinasa C, IP<sub>3</sub>: Inositol Trifosfato. 2.- genómico, en el que el complejo hormona-receptor (P<sub>4</sub>-RP) se une con ERP ubicados en las regiones reguladoras de los genes blanco en el DNA, y así se modula directamente la expresión génica [Tomado de Camacho-Arroyo et al., 2003].



**Figura 5.** Mecanismo de acción genómico de la P<sub>4</sub>. En estado basal, el RP está asociado con proteínas chaperonas como las de choque térmico HSP90 y HSP70. Después de la unión de la P<sub>4</sub> el RP se disocia de las proteínas chaperonas y se dimeriza con otra molécula de RP. El receptor es fosforilado y forma complejos con correguladores como el coactivador SRC-1 y el correpresor SMRT. El RP interactúa con el ERP en la región promotora de los genes blanco de la P<sub>4</sub>, lo cual también induce fosforilación del RP y la maquinaria de transcripción basal es reclutada. A/B, C y D son dominios del RP [Tomado de Camacho-Arroyo et al., 2006].

## 4.2. Receptores intracelulares a P<sub>4</sub>

### 4.2.1. Características

La mayoría de las acciones de la P<sub>4</sub> están mediadas por el RP, que se encuentra localizado en el citoplasma y en el núcleo (Camacho-Arroyo and Rodríguez-Dorantes, 2006). El RP es miembro de una superfamilia de factores de transcripción activados por su ligando, que incluye receptores para hormonas esteroides, hormonas tiroideas, ácido retinóico, así como receptores huérfanos cuyo ligando no ha sido identificado. El gen que codifica al RP presenta una sola copia de más de 90 kb compuesta por 8 exones. En el

humano se localiza en el cromosoma 11 (Rousseau-Merck et al., 1987; Misrahi et al., 1993).

Existen tres dominios característicos de todos los receptores esteroides, que son la región N-terminal, el dominio de unión a ADN (DBD) y el dominio de unión al ligando (LBD) (Fig. 6). Cabe resaltar que el LBD es un dominio multifuncional que une a la hsp90, participa en la dimerización del receptor y en la modulación de la transcripción. Además, se han identificado secuencias específicas a las cuales se pueden unir las proteínas reguladoras y que desempeñan funciones de activación (FA) o inhibición (FI) (Guiochon-Mantel, 2000).

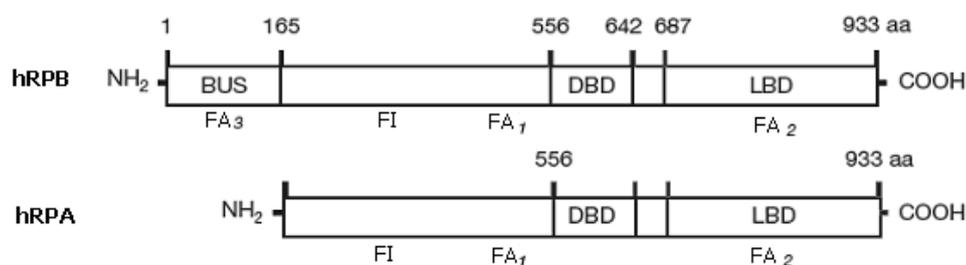


**Figura 6.** Representación esquemática del gen del RP humano (hRP). Se señalan sus 8 exones. El exón 1 codifica el extremo N-terminal del receptor, los exones 2 y 3 codifican el dominio de unión a DNA y cada uno de ellos, además, codifica un dedo de zinc, y los exones 4 – 8 codifican el dominio de unión al ligando [Modificado de Schumacher, 2009].

#### 4.2.2. Isoformas del RP

Se han descrito dos isoformas principales del RP, las cuales se denominan RP-A (en el humano hRP-A, 94 kDa) y RP-B (en el humano hRP-B, 114 kDa). La isoforma A es una forma truncada de la isoforma B, ya que carece de 164 aminoácidos en la región amino terminal. El RP-A posee solamente dos regiones con funciones de activación ( $FA_{1,2}$ ), mientras que el RP-B contiene además una tercera región ( $FA_3$ ) presente en el extremo amino terminal (Fig. 7). Ambas isoformas presentan una región con función inhibidora (FI) localizada en la región adyacente a  $FA_1$  que sólo es funcional en RP-A (Guerra-Araiza and Camacho-Arroyo, 2000). De hecho, la remoción del dominio FI convierte a RP-A en un fuerte activador de la transcripción (Hovland et al., 1998). Estudios cinéticos indican que la constante de unión de la  $P_4$  por RP-A y RP-B es de 1.2 nM y 0.9 nM, respectivamente (Raaijmakers et al., 2009).

Las dos isoformas son codificadas por el mismo gen pero se transcriben a partir de dos secuencias promotoras distintas que dan lugar a diferentes mRNAs.



**Figura 7.** Representación esquemática de las proteínas del hRP-A y hRP-B.

FA<sub>1</sub> – FA<sub>3</sub> indica la localización de funciones activadoras y FI indica funciones inhibitoras. El segmento de 164 aminoácidos del extremo N-terminal del hRPB es conocido como BUS [Modificado de Schumacher, 2009].

Las isoformas del RP pueden tener diferentes funciones dependiendo del tipo de célula, del gen blanco y del promotor (Tung et al., 1993). En muchos sistemas celulares RP-B actúa como un potente activador transcripcional, mientras que RP-A funciona como un represor de la transcripción mediada tanto por RP-B como por otros receptores a hormonas esteroides (Vegeto et al., 1993; Tung et al., 1993; Conneely and Lydon, 2000). Lo anterior se debe a que RP-A tiene mayor afinidad por correpresores como SMRT y RP-B por coactivadores como SRC-1 (Giangrande and McDonnell, 1999).

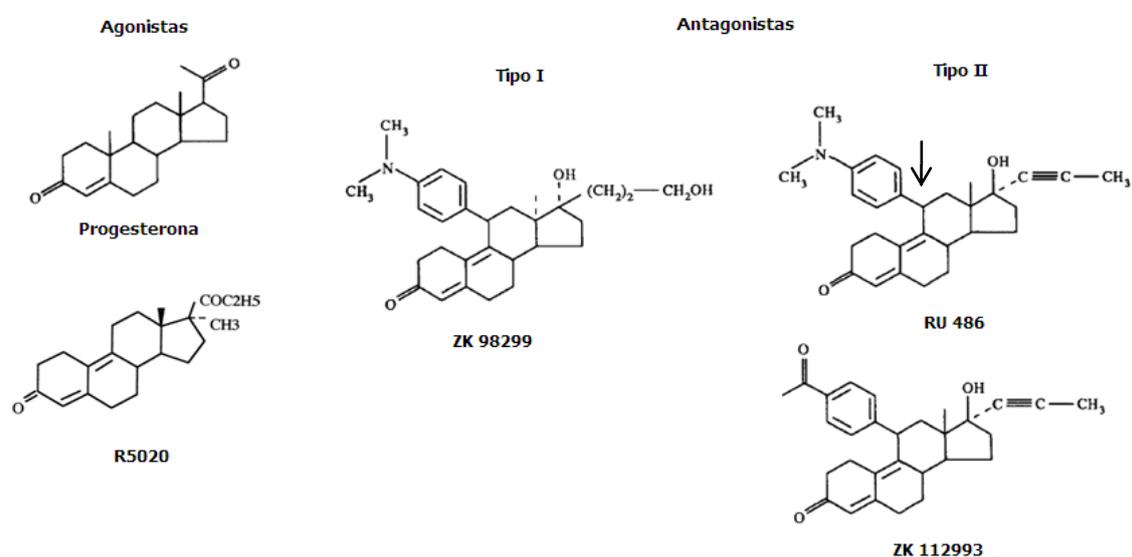
### 4.3. Antagonistas de la P<sub>4</sub>

#### 4.3.1. Generalidades

Se han desarrollado diversos ligandos sintéticos que pueden competir con la P<sub>4</sub> en su unión con el RP, y de esta manera ser capaces de inhibir la actividad del receptor. El primero de ellos en ser desarrollado fue la mifepristona (RU486), la cual es un antagonista de progestinas y glucocorticoides. A partir de ahí, han surgido numerosos ligandos que exhiben

un amplio espectro en su rango de actividad, desde antagonistas de  $P_4$  puros hasta ligandos con actividad de agonista-antagonista (Mahajan and London, 1997).

Las antiprogestinas fueron clasificadas en dos grupos basadas en sus efectos sobre la función del RP *in vitro* (Fig. 8). Los compuestos de tipo I, que incluyen la onapristona (ZK98299), previenen la asociación del RP con los ERP y actúan como antagonistas “puros”, mientras que los compuestos de tipo II cuyo ejemplo principal es el RU486, promueven la disociación entre el RP y las proteínas de choque térmico, la dimerización del RP y la unión al ERP, por lo cual se ha propuesto que el mecanismo antagonista de dichos compuestos implica un cambio conformacional en la estructura del RP, el cual impediría la unión de la  $P_4$  a su receptor y la consecuente activación de la transcripción (Edwards et al., 1995). Se dice que éstos son antagonistas “impuros” o agonistas-antagonistas parciales, ya que también pueden activar al receptor. Se ha observado que en presencia de activadores de la proteína cinasa C como el AMPc, el RU486 tiene actividad de agonista (Chwalisz et al., 2000).

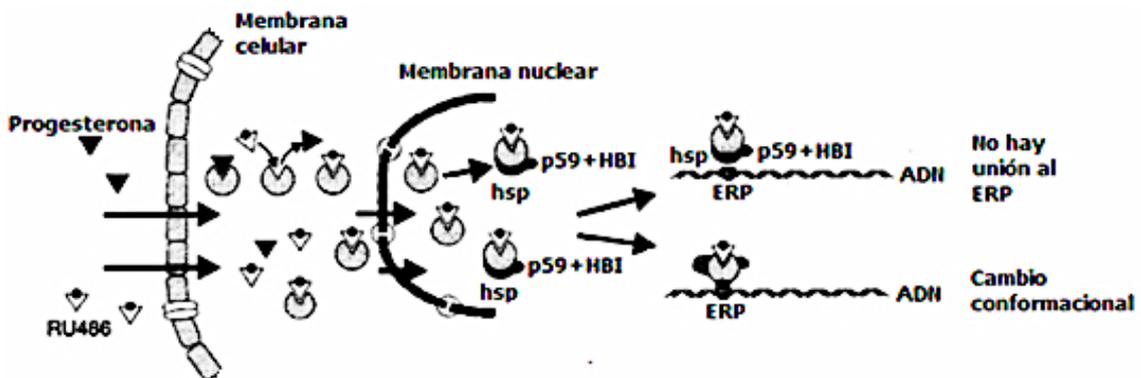


**Figura 8.** Estructura química de agonistas y antagonistas del RP. Se muestra la hormona progesterona, la progestina sintética R5020, la antiprogestina tipo I ZK98299 y las antiprogestinas tipo II RU486 y ZK112993. Se señala la posición 11β en la estructura del RU486 [Modificado de Edwards et al., 1995].

### 4.3.2. Características del RU486

El RU486 es un antagonista de la  $P_4$ , que compite por el sitio de unión al RP con una constante de afinidad ( $K_i$ ) media de  $1.4 \pm 0.3$  nM, mientras que la  $K_i$  media de la  $P_4$  es de 1.1 nM (Raaijmakers et al., 2009). Su principal característica estructural es el grupo fenil-aminodimetil en la posición 11 $\beta$  del esqueleto esteroide, el cual permite mayor interacción con una región específica del sitio de unión al receptor (Fig. 8) (Cadepond et al., 1997). El RU486 se une con gran afinidad tanto al RP ( $K_i = 1.7$  nM) como al receptor a glucocorticoides ( $K_i = 2.2$  nM) (Raaijmakers et al., 2009).

Una vez que el RU486 se ha unido al RP, la interacción del receptor con la proteína de choque térmico 90 y con p59 se hace más fuerte y a partir de allí puede ocurrir: 1.- que las proteínas chaperonas no permitan que el RP se una al ERP ó 2.- que el RP sí se una al ERP pero sufra un cambio conformacional que no permita reclutar a la maquinaria transcripcional (Fig. 9) (Mahajan and London, 1997).



**Figura 9.** Mecanismo de acción del RU486. En ausencia de ligando el RP se encuentra unido a proteínas chaperonas, las cuales cubren el dominio de unión al DNA. El RU486 presenta mayor afinidad por el RP que la  $P_4$  por lo cual se une preferentemente al receptor. Una vez unido, las chaperonas se disocian del RP y este último se une al ERP. El RU486 no permite el inicio de la transcripción ya sea porque la chaperona se vuelve a unir al receptor e impide la unión al ERP, o porque éste sufre un cambio conformacional que no permite la interacción con la maquinaria transcripcional. Chaperonas: proteínas de choque térmico (hsp), p59, complejo hsp-inmunofilina (HBI). ERP: elemento de respuesta a  $P_4$  [Modificado de Mahajan and London, 1997].

La conformación adquirida al unirse el antagonista no permite la interacción con coactivadores y promueve el reclutamiento de correpresores. El RU486 tiene una vida media de aproximadamente 20 horas (Mahajan and London, 1997).

Se sabe que las hormonas esteroideas influyen en el desarrollo y crecimiento de varios tipos de cáncer, por lo cual el entendimiento de la dependencia hormonal de este padecimiento puede brindar herramientas para la elaboración de nuevas terapias (Ahmad and Kumar, 2011).

#### **4.4. Tumores cerebrales**

##### **4.4.1. Astrocitomas**

Los astrocitomas son neoplasias que se originan a partir de un tipo de células gliales llamadas astrocitos. Este tipo de tumores son los más comunes y agresivos del ser humano y representan más del 60% del total de tumores cerebrales primarios.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha elaborado una clasificación que establece una escala de progresión de acuerdo a las características histológicas del tumor (Louis et al., 2007).

- Astrocitoma pilocítico (grado I):

Es un tumor bien delimitado, de crecimiento lento, que suele ser quístico y se presenta generalmente en niños y adultos jóvenes. Histológicamente está compuesto por proporciones variables de células bipolares compactas y células multipolares laxas, con microquistes y cuerpos granulares. Afecta más comúnmente al nervio óptico, quiasma óptico, hipotálamo, tálamo, ganglios basales, hemisferios cerebrales, cerebelo y tronco cerebral. La resección quirúrgica total de un astrocitoma pilocítico solamente está limitada por la proximidad del tumor a alguna estructura crítica, por lo cual es la principal estrategia terapéutica. En la mayoría de los casos donde el tumor ha sido extraído total o parcialmente, las probabilidades de una sobrevida mayor a 20 años son de más del 85% (Tihan and Bloomer, 2010).

- Astrocitoma difuso (grado II)

Se caracteriza por un crecimiento lento e infiltración en estructuras cerebrales vecinas. Generalmente afecta a adultos jóvenes con un pico de incidencia entre los 30 y 40 años y tiende a evolucionar en forma maligna a astrocitoma anaplásico y glioblastoma. Histológicamente está compuesto por astrocitos fibrilares bien diferenciados. Las células tumorales se pueden acumular bajo la piamadre o alrededor de neuronas dañadas (satelitosis). Se localiza en cualquier región del SNC pero con más frecuencia se encuentra en los hemisferios cerebrales, tallo cerebral y médula espinal. El tratamiento puede incluir resección quirúrgica, quimioterapia y/o radioterapia y la media de supervivencia después de la intervención quirúrgica va de 6 a 8 años (Arko et al., 2010).

- Astrocitoma anaplásico (grado III)

Este tipo de tumor puede surgir a partir de un astrocitoma difuso o manifestarse de novo sin la presencia de un precursor. Es el grado más común de astrocitoma y tienden a progresar a glioblastoma. Se caracterizan por presentar una alta actividad mitótica, atipia nuclear y lesiones difusamente infiltrantes. No presentan proliferación vascular (Tihan and Bloomer, 2010). Se localizan preferentemente en los hemisferios cerebrales y el promedio de edad de los pacientes es de 40 años. La media de supervivencia es de 2 a 3 años y generalmente está determinado por el tiempo requerido para la progresión a un tumor de grado IV (Arko et al., 2010).

- Glioblastoma (grado IV)

Se puede generar a partir de un astrocitoma difuso ó anaplásico, sin embargo, lo más frecuente es que aparezca de novo. Se caracteriza por presentar astrocitos poco diferenciados, atipia nuclear, mitosis elevada, trombosis vascular, proliferación microvascular y necrosis. Es altamente infiltrante. La incidencia pico se presenta entre las edades de 45 a 70 años y afecta principalmente a los hemisferios cerebrales. El tratamiento consiste principalmente en la resección quirúrgica del tumor, así como radio y/o quimioterapia, sin embargo, dada su capacidad infiltrante, es prácticamente imposible la extracción total del tumor por lo cual el tiempo de supervivencia es de menos de 1 año (Brandes et al., 2008).

Los síntomas más comunes ocasionados por este grupo de tumores son: déficit neurológico progresivo, debilidad motora, dolor de cabeza y convulsiones (Brandes et al., 2008).

Las alteraciones encontradas en los astrocitomas son resultado de la acumulación de anomalías genéticas, incluyendo aberraciones cromosómicas, mutaciones, así como amplificaciones y rearrreglos génicos. Un gen particularmente susceptible a sufrir modificaciones es el gen supresor de tumores p53, que juega un papel fundamental en la apoptosis, respuesta celular ante daños al DNA, arresto del ciclo celular y neovascularización. También se han encontrado alteraciones en la vía del retinoblastoma y defectos en cascadas de factores de crecimiento como PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas) y EGF (factor de crecimiento epidérmico) (Sauvageot et al., 2007).

El tratamiento de los gliomas depende de su tamaño, localización, alcance de resección y grado histológico, sin embargo, como ya se mencionó, en los astrocitomas de grados III y IV no se ofrece una perspectiva de curación a largo plazo. Es por ello que se está trabajando en la búsqueda de nuevas estrategias de tratamiento que sean eficaces y mejoren la supervivencia de los pacientes.

#### **4.5. P<sub>4</sub> y astrocitomas**

Se han realizado estudios donde se reporta que el RP se expresa de manera diferencial en los astrocitomas dependiendo del grado de evolución de los mismos, observando una relación directa entre el contenido de RP y el grado del tumor. También se encontró que aunque la mayoría de los astrocitomas expresan ambas isoformas del RP, la isoforma predominante en astrocitomas grados III y IV obtenidos de biopsias de pacientes mexicanos es el RP-B (González-Agüero et al., 2001); sin embargo, en estudios realizados en líneas celulares de astrocitomas grado IV se ha observado que la isoforma predominante es RP-A (González-Agüero et al., 2007).

El RP participa en la regulación del crecimiento celular en tumores cerebrales, ya que la administración de  $P_4$  incrementa la proliferación celular en cultivos de astrocitomas humanos, mientras que su antagonista, el RU486 bloquea los efectos de la  $P_4$  y con su sola administración inhibe el crecimiento celular (González-Agüero et al., 2007).

En diversos tipos celulares el RP se encuentra regulado tanto por estradiol ( $E_2$ ) como por  $P_4$ , siendo que el contenido de RP en células U373 (astrocitoma humano de grado III) aumenta después de tratarlas con  $E_2$ , lo cual no se observa en las células D54 (astrocitoma humano grado IV). Esto último podría estar relacionado con los cambios génicos y metabólicos que ocurren en el grado de evolución más avanzado de los astrocitomas. Mientras tanto, la  $P_4$  actúa como un regulador a la baja del RP por un mecanismo de proteólisis dependiente de ligando, ya que cuando la  $P_4$  se une a su receptor induce su fosforilación, lo cual es una señal para la degradación por la vía ubiquitina-proteosoma (Cabrera-Muñoz et al., 2009).

El mecanismo molecular a través del cual el RU486 ejerce sus efectos en las líneas celulares de astrocitomas humanos aún no está completamente entendido, sin embargo, se ha observado que la disminución del número de células posterior a la administración de dicho compuesto no es debida a apoptosis, por lo cual es posible que los efectos sean ocasionados por un retraso en la replicación del DNA, inhibiendo de esta manera el avance del ciclo celular (González-Agüero et al., 2007).

Adicionalmente, se han realizado experimentos *in vitro* con células obtenidas de pacientes con endometriosis, en los cuales también se observó que el RU486 presenta actividad antiproliferativa. En este estudio se sugiere que la actividad podría estar relacionada con las propiedades antioxidantes de dicho compuesto, ya que inhibe la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) las cuales se ha observado que pueden activar algunas vías de señalización involucradas en proliferación celular, por ejemplo, aumentando la actividad de la proteína cinasa C, así como la expresión de ciertos protooncogenes (Parthasarathy et al., 1994; Murphy et al., 2000).

Por otro lado, Klijn y colaboradores elaboraron una lista con los posibles mecanismos de acción de las antiprogestinas en el cáncer de mama,

padecimiento en el cual también se ha reportado que inhiben la proliferación celular. Entre dichos mecanismos se mencionan los siguientes:

- Bloqueo del ciclo celular en la fase  $G_0/G_1$
- Inducción de la fragmentación del DNA
- Regulación a la baja de bcl-2 (proteínas que regulan la apoptosis)
- Inducción de la síntesis de TGF- $\beta$  (proteína que participa en el control del crecimiento celular, proliferación celular, diferenciación y apoptosis).
- Bloqueo de la secreción de VEGF inducida por  $P_4$

Éstos generalmente ocurren por vía del RP ya que se ha observado que existe una relación directa entre la concentración del receptor y el efecto antitumoral que ejercen las antiprogestinas (Klijn et al., 2000).

## 5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se han realizado estudios *in vitro* donde se reporta que en las líneas celulares derivadas de astrocitomas humanos U373 y D54 la P<sub>4</sub> induce proliferación celular, y que este efecto es bloqueado por el antagonista RU486. De hecho, se observó que la sola administración del RU486 inhibió el crecimiento celular, lo cual podría ser importante para establecer una terapia para el tratamiento de estos tumores. Sin embargo, la participación de la P<sub>4</sub> y el RU486 en el crecimiento de células derivadas de astrocitomas humanos no se ha estudiado en modelos *in vivo*, por lo cual en este trabajo se estudió el efecto de dichos compuestos sobre el crecimiento de las células U373 implantadas en la corteza cerebral de la rata, a través de un análisis histológico y pruebas motoras.

## 6. HIPÓTESIS

Si la P<sub>4</sub> favorece la proliferación de los astrocitomas humanos grado III, entonces su antagonista el RU486 inhibirá dicha progresión en un modelo *in vivo*, lo cual podrá ser observado a nivel motor y mediante un análisis histológico.

## 7. OBJETIVOS

### 7.1. Objetivo general

- Estudiar el efecto de la P<sub>4</sub> y del RU486 sobre el desarrollo de astrocitomas humanos grado III a partir de células U373 implantadas en la corteza cerebral de la rata.

### 7.2. Objetivos particulares

- Evaluar el desarrollo de un tumor formado a partir del implante de células de astrocitoma humano grado III bajo distintos tratamientos (P<sub>4</sub>, RU486 y P<sub>4</sub> + RU486) mediante análisis histológicos.
- Establecer la participación del RP en el mecanismo de proliferación celular inducido por P<sub>4</sub> mediante el tratamiento con RU486.
- Determinar si la administración de P<sub>4</sub> y/o RU486 modifica las deficiencias motoras inducidas por la progresión de un tumor desarrollado a partir de células de un astrocitoma humano grado III.

## 8. METODOLOGÍA

### 8.1. Cultivo celular

La línea celular U373, derivada de astrocitomas humanos grado III, se cultivó en medio DMEM con rojo fenol suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10% y se incubó a 37°C en una atmósfera 95% aire / 5% CO<sub>2</sub> y 95% de humedad. El medio se cambió cada 48 horas hasta alcanzar una confluencia celular de 70 – 80%. Una vez obtenida dicha confluencia, se contó el número de células en una cámara de Neubauer, se separaron 120,000 células U373 y se centrifugaron a 3,500 rpm durante 3 minutos.

### 8.2. Implante de células tumorales en el cerebro de la rata

Se trabajó con ratas macho adultas de la cepa Wistar de 250 – 300 g de peso. Cada rata se anestesió con una inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico (30 mg/kg) y se colocó en el aparato estereotáxico. Se desinfectó la parte superior de la cabeza del animal con un algodón empapado en Isodine<sup>®</sup> y se rasuró el área. Posteriormente se realizó una incisión en dirección anteroposterior y se retrajo el tejido. Se goteó un poco de agua oxigenada sobre el cráneo y se raspó con el bisturí para retirar el tejido conectivo del mismo. Se localizaron las coordenadas 1.6 mm anterior y 3 mm lateral izquierdo con respecto a Bregma correspondientes a la corteza cerebral motora y se realizó un trépano en ese sitio. Posteriormente se insertó una cánula, la cual estaba conectada a una microjeringa que contenía 120,000 células U373 en un volumen de 2 µL, y éstas se inyectaron a lo largo de 2 minutos a través de la cánula. Se dejaron pasar 5 minutos para permitir el asentamiento de las células implantadas y se extrajo la cánula. Se colocó cera para hueso suficiente para cubrir el sitio de trepanación. Finalmente, se goteó gentamicina sobre la superficie craneal y se suturó la piel. El animal se dejó en recuperación con alimento y agua *ad libitum*. El antibiótico enrofloxacin (10 mg/kg) fue agregado al agua de beber durante las siguientes 48 horas.

### 8.3. Tratamientos

De manera aleatoria se formaron 4 grupos experimentales con 7 ratas cada uno y se trabajó con los siguientes esquemas de tratamiento (por rata):

Grupo 1: 1 mg de P<sub>4</sub>

Grupo 2: 5 mg de RU486

Grupo 3: 5 mg de RU486 + 1 mg de P<sub>4</sub>

Grupo 4: vehículo (propilenglicol)

La administración de los tratamientos se realizó diariamente, por vía subcutánea durante 20 días, e iniciaron 18 días después del implante de células U373.

La preparación de las hormonas se llevó a cabo disolviendo 1 mg de P<sub>4</sub> (RBI) en 80 µL de propilenglicol y 5 mg de RU486 (SIGMA) en 240 µL de propilenglicol.

### 8.4. Pruebas motoras

A lo largo de 30 días (5 días antes del tratamiento, durante el mismo y 5 días después del tratamiento) se realizaron algunas pruebas de fuerza y equilibrio a las ratas. Ya que el implante de células U373 se realizó en la corteza motora del hemisferio izquierdo en la zona que controla el movimiento de la extremidad inferior y que los impulsos motores viajan de manera contralateral desde la corteza hasta la médula espinal, la primera prueba de fuerza consistió en colocar a la rata en un espacio abierto, sujetar entre 2 dedos la pata inferior derecha y valorar la fuerza con la que intentó retirarla comparando con la otra extremidad. La segunda prueba consistió en colocar a la rata en una reja en posición vertical y observar de qué manera usó su pata inferior para trepar y sostenerse, en comparación con el resto de las extremidades. Finalmente, para evaluar el equilibrio de la rata, ésta se sujetó y se volteó de manera que quedara en posición dorsal y se consideró el tiempo que tardó en recuperar su posición. La calificación de todas las pruebas se

realizó con una escala numérica (1, 2, 3) que correspondió a un pobre, mediano y alto desempeño, respectivamente. En la primera prueba, al sujetar la pata de la rata la reacción esperada es que intente retirarla ejerciendo fuerza con la misma, sin embargo, en algunos casos, la rata intentaba escapar sin que se sintiera ninguna presión proveniente de la pata estudiada, a este tipo de comportamiento se le calificó como 1. A partir de esto, las calificaciones 2 y 3 se asignaron con base en la fuerza ejercida por la rata con la pata derecha (ya que el implante del tumor fue en la corteza cerebral izquierda) siendo el 2 una fuerza intermedia y el 3 el mejor desempeño.

Para la segunda prueba la calificación de 1 se aplicó a aquellas ratas que no utilizaron su pata derecha al momento de trepar por la reja, es decir, que no se sujetaban de los barrotes o que incluso la mantuvieron de manera laxa durante toda la prueba. La calificación de 2 correspondió a ratas que sí utilizaron su pata para trepar, pero frecuentemente se soltaban y resbalaban, y la calificación de 3 se asignó a las ratas que no tuvieron ninguna deficiencia en la pata derecha al momento de trepar por la reja.

Finalmente, en la tercera prueba, al colocar a la rata en posición dorsal se esperaba que se incorporara de manera inmediata. Se asignó como parámetro que las ratas que tardasen 10 segundos ó más en incorporarse se calificarían como 1, aquellas que lo hicieran entre 1 y 9 segundos se calificarían como 2 y las que lo hicieran de manera inmediata, como 3.

### **8.5. Análisis histológicos**

Después de 20 días a partir de la última administración, las ratas fueron sacrificadas con una sobredosis de pentobarbital sódico (80 mg/kg) administrado por vía intraperitoneal. Se dejó pasar este lapso de tiempo para asegurar que los efectos de las hormonas fueran duraderos y que pudieran observarse aún cuando las ratas ya no se encontraban bajo tratamiento. Cada rata fue perfundida con 500 mL de solución salina y 500 mL de formalina (solución de formaldehído al 4% y cloruro de sodio al 0.81% en agua

desionizada) y se les extrajo el cerebro, el cual se conservó en formalina hasta el momento del corte.

Se realizaron cortes de 10 µm de grosor a la altura del sitio de implante con un criostato (Leica CM1850) a -18°C y posteriormente se tiñeron con el método de Nissl, cuyo procedimiento se enlista a continuación:

- Los cortes montados en portaobjetos se colocaron de manera secuencial en recipientes de vidrio que contenían los siguientes reactivos
  - 1.- Etanol al 70% durante 2.5 minutos
  - 2.- Etanol al 80% durante 2.5 minutos
  - 3.- Etanol al 95% durante 2.5 minutos
  - 4.- Agua destilada durante 2.5 minutos
  - 5.- Colorante (violeta de cresilo) durante 15 minutos
  - 6.- Etanol al 95% bajo agitación
  - 7.- Etanol al 95% con 20 gotas de ácido acético al 10% bajo agitación
  - 8.- Alcohol absoluto durante 2.5 minutos
  - 9.- Xilol durante 2.5 minutos
- Finalmente se cubrieron los cortes con un cubreobjetos utilizando la resina PolyMount (Polysciences, Inc.) y se dejaron secar durante 24 horas a temperatura ambiente.

Los cortes teñidos se observaron al microscopio y se cuantificó el área de los tumores así como la distancia de infiltración de los mismos usando el programa Image-Pro Plus 7.0 (MediaCybernetics). Para identificar a las células tumorales como primer paso se ubicó el sitio de implante, que en la mayoría de los casos se observó como una ligera depresión en el tejido e incluso, en algunas muestras, fue notoria la trayectoria que siguió la cánula a través de la corteza cerebral. A partir de allí se procedió a examinar el tejido circundante donde pudieron observarse distintas texturas y arreglos. Las células U373 se identificaron por presentar una coloración más intensa, así como variaciones en morfología y tamaño celular. También se observó que en algunas ocasiones el tejido tumoral tenía apariencia más laxa que el tejido sano y con mayor cantidad de tejido fibroso.

Para cuantificar la infiltración se midió la distancia a partir del sitio del implante hasta el punto central del tumor.

### **8.6. Análisis estadístico**

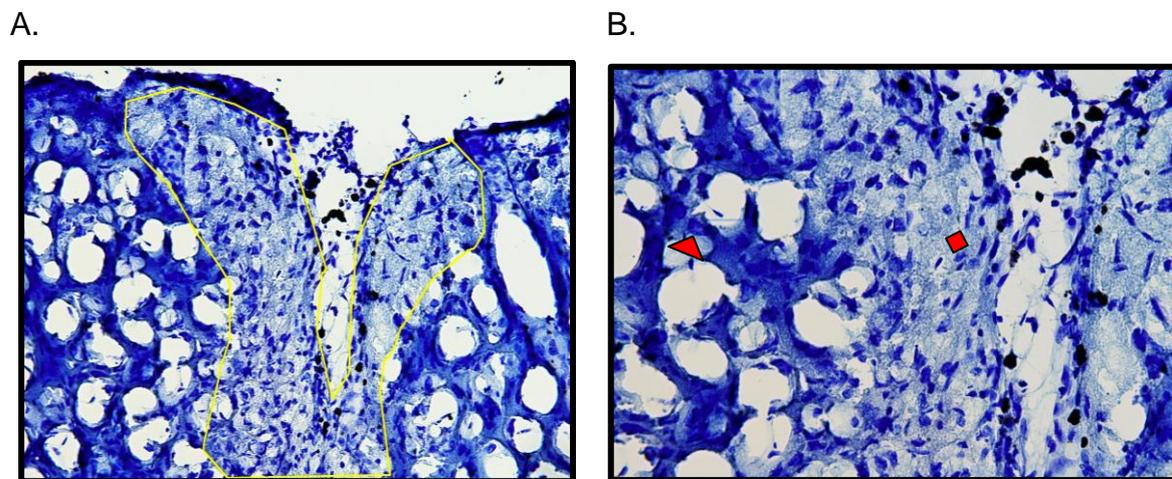
A los datos de área de los tumores se les realizó un análisis a través de la prueba ANOVA, seguida por una prueba de Dunnet y una prueba de Bonferroni para la comparación entre grupos.

Los resultados de infiltración se analizaron con la prueba chi cuadrada y los datos de los estudios motores con la prueba Kruskal – Wallis seguida por una prueba de Dunn. Se utilizó el programa Prisma 4.0 en todos los análisis estadísticos para calcular los valores de probabilidad.

## 9. RESULTADOS

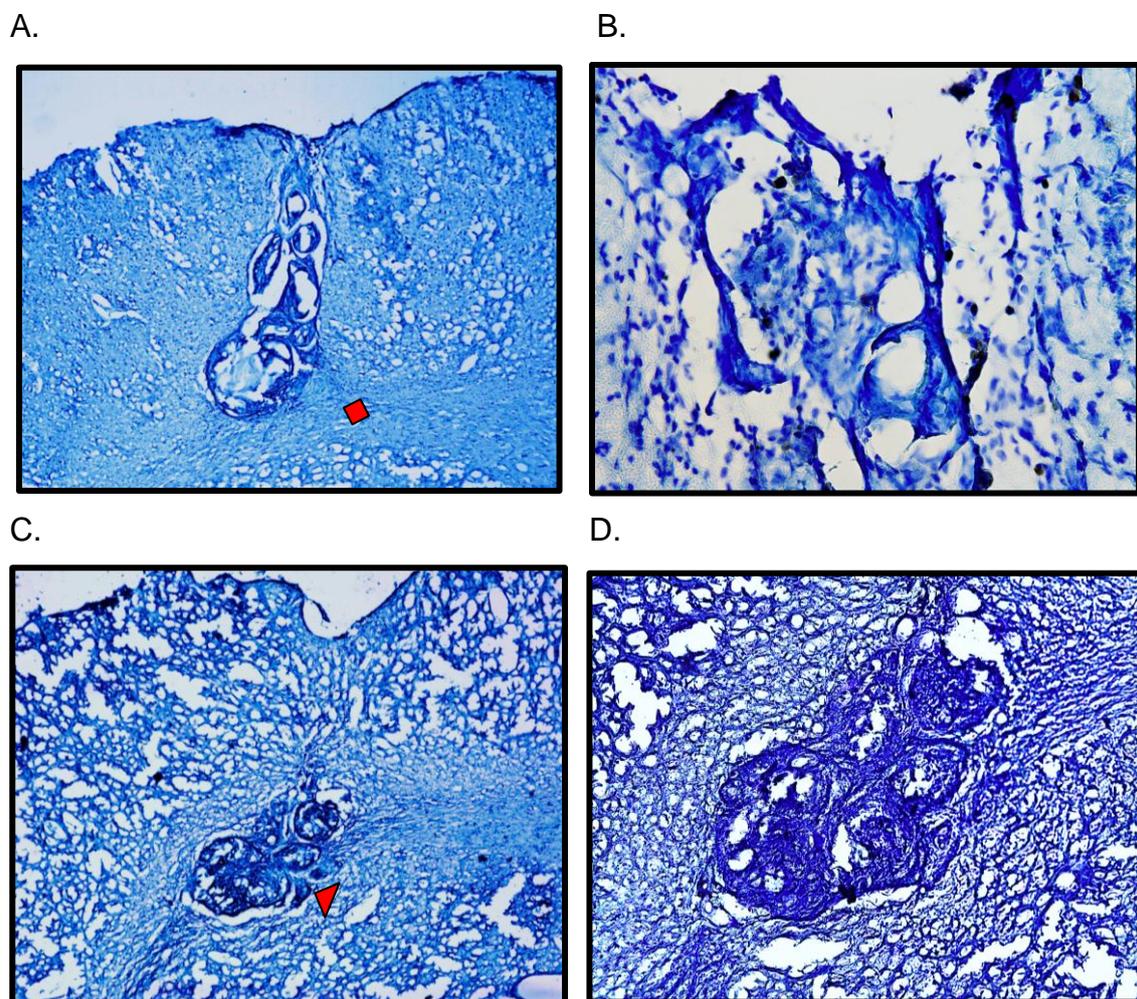
En el presente trabajo se estudiaron los efectos de la  $P_4$  y el RU486 sobre la progresión de astrocitomas humanos grado III implantados en la corteza cerebral de ratas. Para ello se cuantificó el área de los tumores y la longitud de infiltración después de un esquema de administración de 20 días con  $P_4$ , RU486,  $P_4$  + RU486 y propilenglicol. También se realizaron pruebas motoras con el fin de evaluar si la progresión del tumor se relaciona con alteraciones a nivel motor.

En la figura 10 se observa que en las ratas administradas solamente con propilenglicol el tumor se mantuvo alrededor del sitio de implante, mostrando mayor cantidad de tejido fibroso organizado de una manera más laxa, células de menor tamaño y de forma más variada en comparación con el tejido sano.



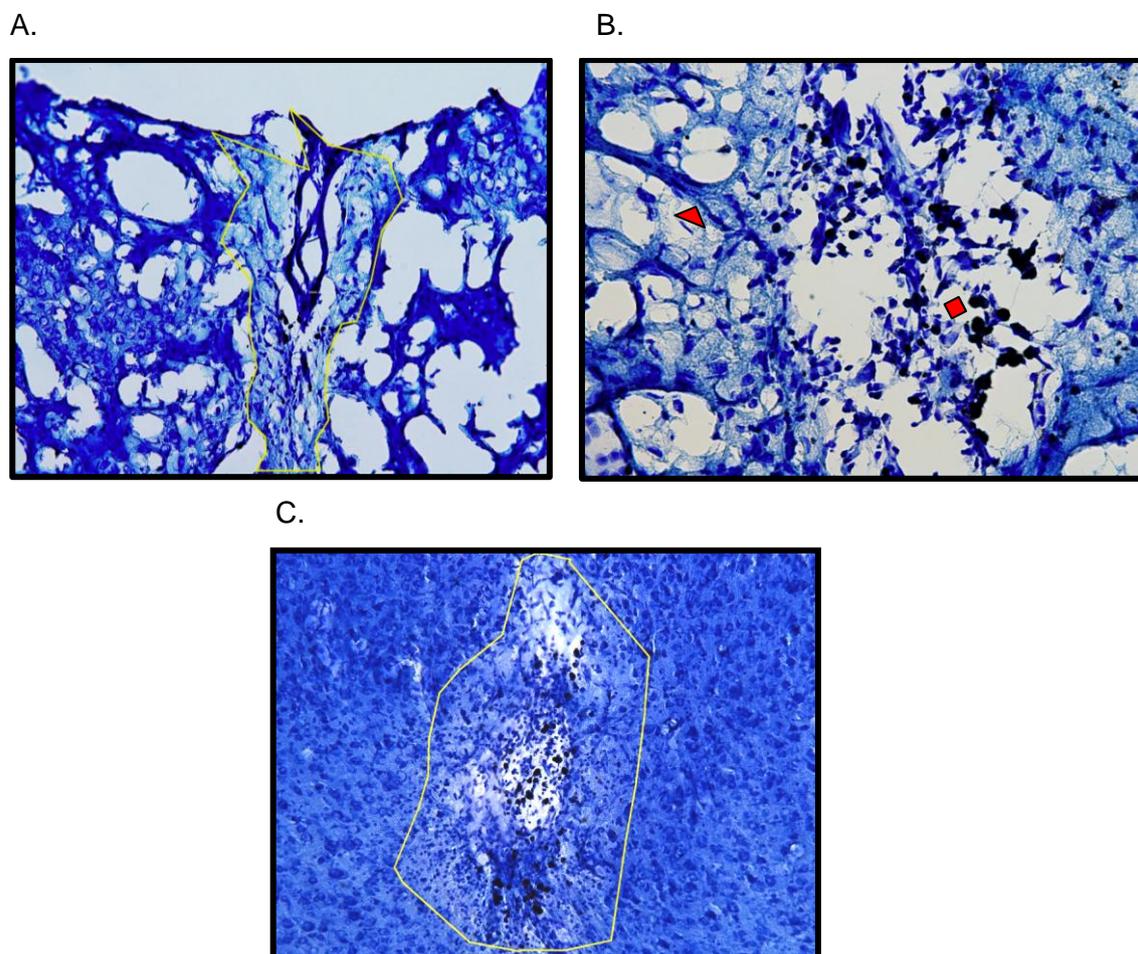
**Figura 10.** Efecto de la administración de propilenglicol sobre el crecimiento e infiltración de células U373 implantadas en la corteza cerebral de la rata. A.- Observación a 20X. El área del tumor se enmarca en amarillo. B.- (40X). Nótese la diferencia en tamaño y forma de las células tumorales (◊) con respecto al tejido sano (◄).

En la figura 11 se muestran los cortes histológicos de las ratas tratadas con  $P_4$ , las cuales mostraron un mayor desarrollo del tumor, así como infiltración del mismo hacia estructuras más profundas del cerebro. Cerca del sitio de implante, se pueden observar células pequeñas de forma ovalada y alargada. La infiltración ocurrió de manera vertical, con una ligera inclinación con respecto al sitio de implante. Al llegar al cuerpo caloso se formó una alteración en el tejido, donde éste perdió su estructura y ya no se pudieron identificar cuerpos celulares, observándose solamente tejido amorfo que podría corresponder a una necrosis cerebral.



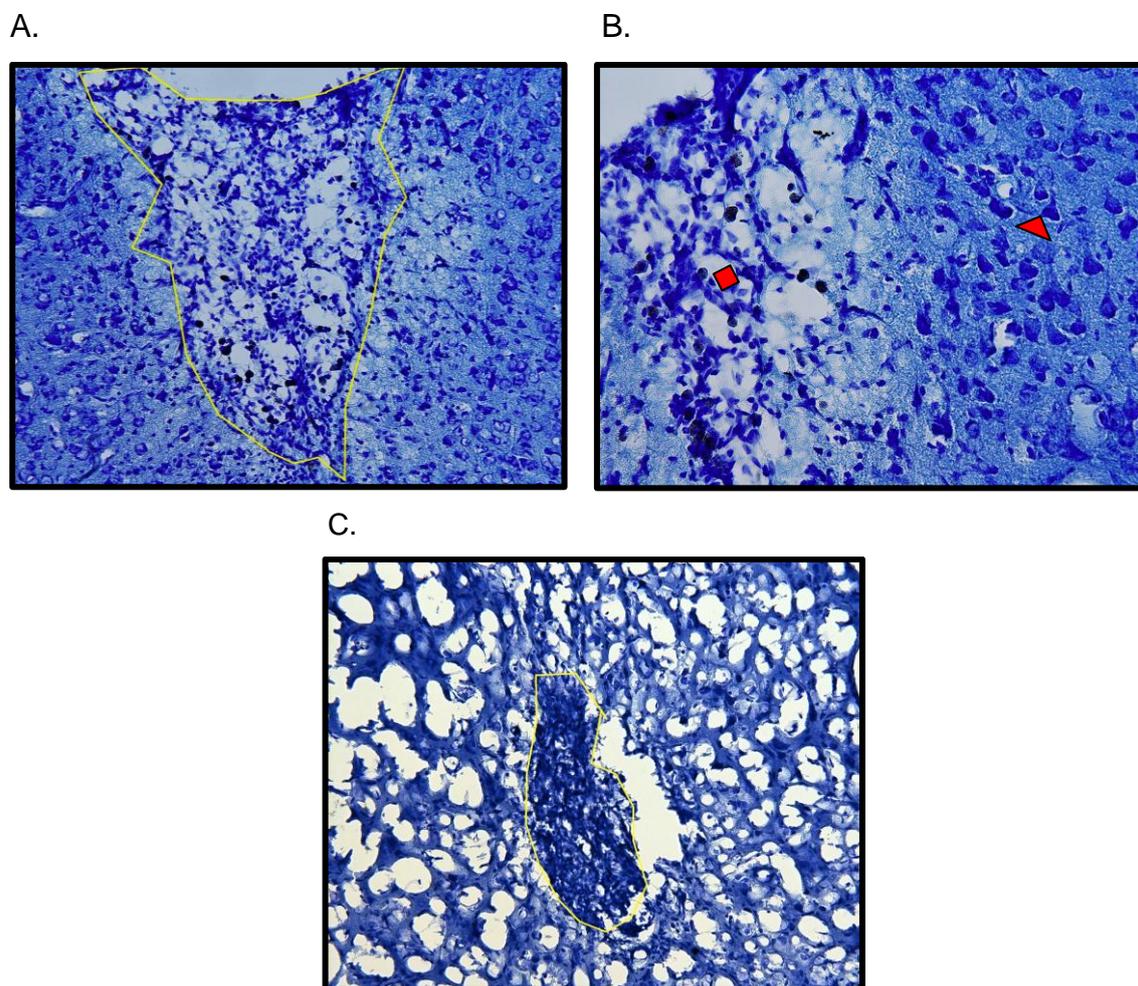
**Figura 11.** Efecto de la administración de  $P_4$  sobre el crecimiento e infiltración de células U373 implantadas en la corteza cerebral de la rata. A.-Observación a 4X. El tumor abarca desde la corteza cerebral hasta el cuerpo caloso (◊). B.- (20X). Células y tejido tumoral en la corteza cerebral. C.- (4X). Infiltración del tumor (◄) a estructuras internas del cerebro. D.- (10X). Detalle del tejido tumoral.

Las ratas que fueron tratadas con RU486 (Fig. 12) mostraron desarrollo tumoral alrededor del sitio de implante con una ligera infiltración. Las células tumorales presentaron formas y tamaños variados, en comparación con el tejido sano. En general, se observaron células pequeñas, redondas o con bordes alargados, escaso tejido conectivo y algunas áreas con tejido necrosado, pero a diferencia de las ratas tratadas con P<sub>4</sub> éste se encontró solamente en la superficie las cerebro y aislado del resto del tejido, además de presentar un área considerablemente menor.



**Figura 12.** Efecto de la administración de RU486 sobre el crecimiento e infiltración de células U373 implantadas en la corteza cerebral de la rata. A.- Observación a 20X. Tejido tumoral, con algunas regiones de tejido amorfo. B.- (40X). En el centro se observan células U373 (♦) rodeadas de tejido sano (◄). C.- (20X). Infiltrado de células tumorales. Las células U373 se muestran enmarcadas en amarillo.

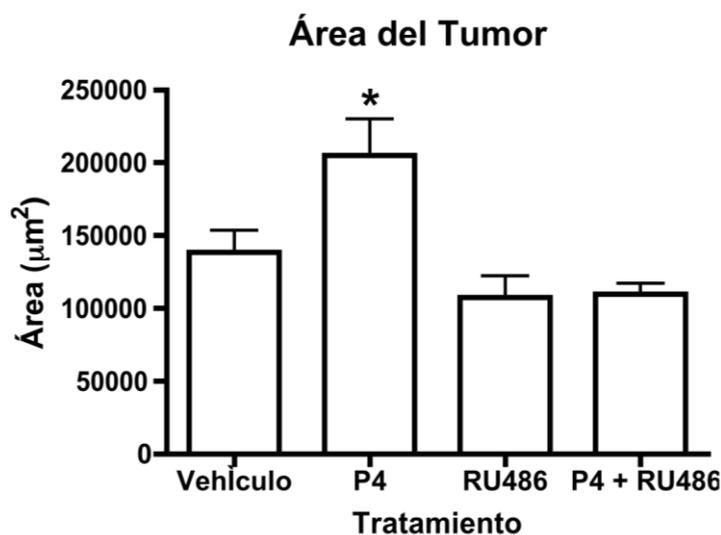
En la figura 13 se muestran los cortes histológicos de las ratas que recibieron el tratamiento conjunto de P<sub>4</sub> + RU486. La morfología de las células tumorales es similar a la descrita en los casos anteriores, células pequeñas con extremos ligeramente alargados, aunque en este caso se encontró más variedad de formas. De igual manera, se observó un mayor número de células en este tratamiento que en los casos anteriores, y éstas, al parecer, se encontraban sin tejido fibroso de soporte. También se observó infiltración de células tumorales la cual fue menor que la encontrada en las ratas tratadas con P<sub>4</sub> y ligeramente mayor que en el tratamiento con RU486.



**Figura 13.** Efecto de la administración de P<sub>4</sub> + RU486 en células U373 implantadas en la corteza cerebral de la rata. A.- Observación a 20X. Las células implantadas se encuentran enmarcadas en amarillo. B.- Observación a 40X. A la izquierda se encuentran las células tumorales (◈) y a la derecha el tejido sano (◄). C.- Observación a 20X. Infiltración del tumor enmarcado en amarillo.

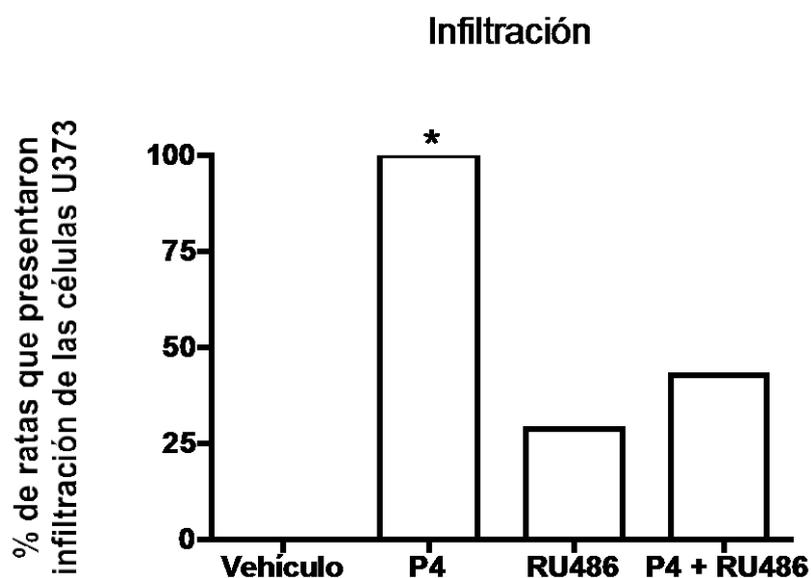
El tratamiento con  $P_4$  aumentó de manera significativa el área del astrocitoma provocado por el implante de células U373 en la corteza cerebral de la rata, así como la longitud de infiltración y el número de ratas que la presentaron (Figs. 14 y 15). El RU486 bloqueó el efecto de la  $P_4$ .

En el caso del área del tumor cabe mencionar que a pesar de que los tratamientos de RU486 y  $P_4$  + RU486 comparados con el vehículo son estadísticamente similares, se observa una tendencia hacia un menor desarrollo del tumor en los grupos tratados con RU486 (Fig. 14).



**Figura 14.** Efectos de la  $P_4$  y el RU486 sobre el área de los tumores provocados por el implante de células U373 en la corteza cerebral de la rata. Los resultados son expresados como media  $\pm$  S.E.M. n vehículo= 4; n resto de los tratamientos= 7. \* $p < 0.001$  vs todos los grupos.

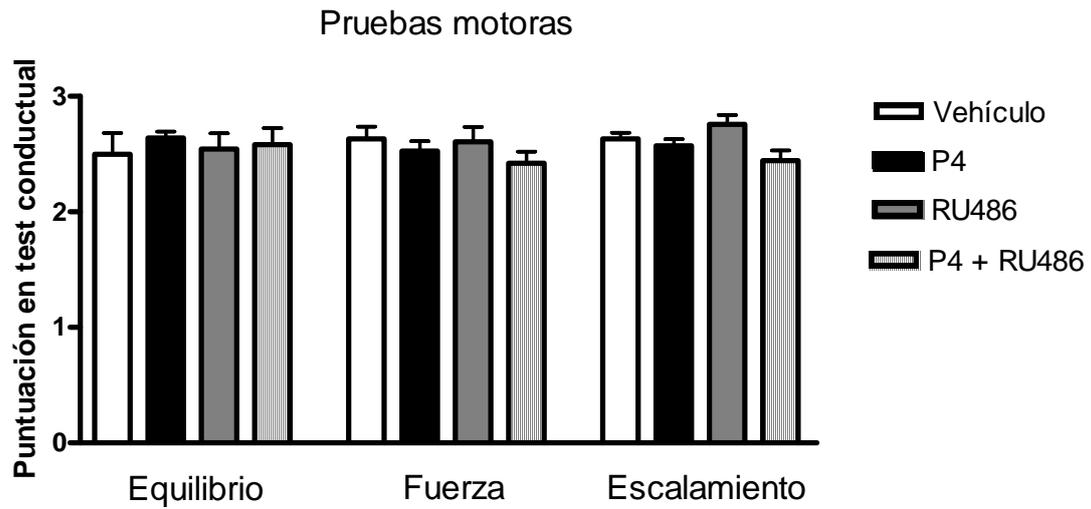
En cuanto a la infiltración del tumor (Fig. 15) se observa que el 100% de las ratas tratadas con  $P_4$  mostraron migración celular hacia estructuras internas del cerebro, mientras que de los animales que recibieron los tratamientos con RU486 y  $P_4$  + RU486 solo el 28.6 y 42.9% respectivamente, presentaron infiltración tumoral. Las ratas administradas con vehículo no mostraron migración de las células U373.



**Figura 15.** Porcentaje de animales que mostraron infiltración de los tumores provocados por el implante de células U373 en la corteza cerebral de la rata bajo el efecto de P<sub>4</sub> y RU486. n vehículo= 4; n resto de los tratamientos= 7. \*p<0.05 vs. todos los grupos.

Por otro lado, es muy notable el incremento en la migración que se observa en las ratas tratadas con P<sub>4</sub>, siendo la distancia media con este tratamiento de  $1119 \pm 45.6 \mu\text{m}$ . Con el tratamiento de RU486 es de  $82.2 \pm 35.4 \mu\text{m}$  y con el de P<sub>4</sub> + RU486 de  $121.6 \pm 43.3 \mu\text{m}$ . Los resultados obtenidos de los tratamientos con el antagonista no presentan diferencias significativas entre ellos, sin embargo, es importante destacar que nuevamente el RU486 bloqueó el efecto de la P<sub>4</sub>.

Posteriormente se realizaron 3 pruebas motoras para determinar el efecto de la progresión del tumor en la conducta motora de la rata, sin embargo, no se observaron diferencias significativas en el desempeño de la rata bajo los distintos tratamientos en ninguna de las pruebas realizadas (Fig. 16).



**Figura 16.** Efectos de la P<sub>4</sub> y RU486 sobre la habilidad motora de ratas con tumores provocados por el implante de células U373 en la corteza cerebral. Los resultados son expresados como media  $\pm$  S.E.M. n vehículo= 4; n resto de los tratamientos = 7.

## 10. DISCUSIÓN

En el presente estudio se determinó el efecto de la administración de P<sub>4</sub> y su antagonista, el RU486 en ratas macho previamente implantadas con células de astrocitoma humano grado III en la corteza cerebral del hemisferio izquierdo. Los resultados constaron de tres puntos principales que fueron la medición del área de los tumores, la longitud de la infiltración de los mismos y la realización de pruebas motoras.

Respecto al primer punto, se encontró que la P<sub>4</sub> aumenta de manera significativa el crecimiento del tumor. Estos resultados concuerdan con lo observado en experimentos *in vitro* realizados en la línea celular U373 en cultivo (Cabrera-Muñoz et al., 2011; González-Agüero et al., 2007; Inoue, 2002). Adicionalmente se ha reportado que en células U373, la P<sub>4</sub> incrementa significativamente la fase S del ciclo celular (González-Agüero et al., 2007), lo cual podría explicar el aumento en la proliferación celular, y por lo tanto, en el área del tumor. También se observó que el RU486 bloqueó el efecto de la P<sub>4</sub>, ya que en las ratas a las que se les administró el tratamiento conjunto de P<sub>4</sub> + RU486 el tamaño del tumor fue significativamente menor al observado en aquellas administradas sólo con P<sub>4</sub>. Este resultado concuerda con lo ya reportado en estudios *in vitro* en nuestro laboratorio (Cabrera-Muñoz et al., 2011; González-Agüero et al., 2007) y sugiere que los efectos de la P<sub>4</sub> en los astrocitomas ocurren a través de la vía genómica, mediados por su receptor intracelular. Como ya se había mencionado, existe una distribución diferencial del RP de acuerdo al grado de evolución del tumor, encontrándose una relación directa entre el contenido de RP y el grado del tumor (González-Agüero et al., 2001). Cabe mencionar que la isoforma predominante tanto en cultivo celular como en biopsias de astrocitomas humanos grado III es el RP-B, el cual es un potente activador transcripcional (González-Agüero et al., 2001, 2007).

Otro punto importante es la tendencia que se observa en los grupos tratados con RU486 y con P<sub>4</sub> + RU486 hacia un menor crecimiento del tumor comparando con el vehículo. Aunque en este trabajo la diferencia entre ellos no

fue significativa, sería interesante continuar con los estudios sobre este punto de una manera más específica y a un mayor tiempo.

En cuanto a la infiltración de las células tumorales, la  $P_4$  incrementó de manera significativa la distancia y el número de animales que mostraron migración de las células U373 en el cerebro de la rata. Los resultados obtenidos en este trabajo no han sido reportados en astrocitomas, sin embargo, existen estudios en cáncer de mama donde se observa que tanto la  $P_4$  como el  $E_2$  incrementan la migración e invasión en las líneas celulares MCF7 y T47D y que el tratamiento con RU486 disminuye significativamente la migración en esas células (Epstein Shochet et al., 2012; Diaz et al., 2012). El bloqueo del efecto de la  $P_4$  sobre la migración del tumor por parte del RU486 también se observó en este trabajo, por lo que podríamos suponer que dicho efecto ocurre a través de la interacción de la  $P_4$  con el RP.

Las ratas tratadas con RU486 y  $P_4$  + RU486 presentaron infiltración de las células tumorales, mientras que aquellas que solo recibieron el vehículo no mostraron migración de las mismas. Esto podría sugerir que el RU486 participa en la activación de ciertos genes que promueven la migración y/o invasividad de las células U373, sin embargo, es necesario realizar estudios referentes a este aspecto de la biología de los tumores.

Un punto interesante con respecto a este tema es el aspecto del tejido infiltrado. En las ratas tratadas con  $P_4$  (Fig. 11) se puede observar como éste perdió su morfología, convirtiéndose en un tejido amorfo con características de necrosis en el cual ya no se pueden identificar cuerpos celulares. Algo similar ocurre en las ratas administradas con el tratamiento conjunto de  $P_4$  + RU486 (Fig. 13), pero en menor medida y con una menor cantidad de tejido afectado, mientras que en las ratas tratadas con RU486 (Fig. 12) las células infiltradas conservan su morfología y no hay tejido dañado.

Por otro lado, se han realizado estudios acerca de las rutas de migración de los astrocitomas, donde se reporta que éstos tienen vías preferenciales que viajan a lo largo y dentro de fascículos nerviosos paralelos y entrecruzados. Se han llevado a cabo estudios en ratas donde se observó que en los tumores implantados en la corteza cerebral la dirección de migración fue a través del

cuerpo calloso pudiendo penetrar profundamente en el mismo, lo cual concuerda con los resultados obtenidos en este trabajo (Laws et al., 1993).

Finalmente, respecto a las pruebas motoras no se observaron cambios significativos relacionados a la progresión del tumor en ninguno de los tratamientos. Esto pudo ser debido a que las pruebas elegidas no fueron lo suficientemente finas para reflejar un daño a ese nivel, además de que la escala de calificación (1, 2 y 3) fue muy estrecha y no permitió que hubiera gran variación entre los resultados. De igual manera, la forma de cuantificar el desempeño fue un tanto arbitraria, por lo cual convendría establecer nuevas características para analizar, así como un esquema más cuantitativo para hacerlo. Además sería importante evaluar la conducta motora a un mayor tiempo de evolución tumoral.

## 12. CONCLUSIONES

La  $P_4$  favorece el crecimiento e infiltración de un tumor provocado por el implante de células de astrocitoma humano grado III en la corteza cerebral de la rata.

Los efectos de la  $P_4$  sobre la proliferación e infiltración de los astrocitomas en la corteza cerebral de la rata ocurren a través de su interacción con el RP.

---

## 12. REFERENCIAS

- Ahmad, N., and Kumar, R. (2011). Steroid hormone receptors in cancer development: a target for cancer therapeutics. *Cancer Letters* 300, 1–9.
- Arko, L., Katsyv, I., Park, G. E., Luan, W. P., and Park, J. K. (2010). Experimental approaches for the treatment of malignant gliomas. *Pharmacology & Therapeutics* 128, 1–36.
- Blackmore, P. F. (1993). Rapid non-genomic actions of progesterone stimulate  $Ca^{2+}$  influx and the acrosome reaction in human sperm. *Cellular Signalling* 5, 531–538.
- Brandes, A. A, Tosoni, A., Franceschi, E., Reni, M., Gatta, G., and Vecht, C. (2008). Glioblastoma in adults. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 67, 139–152.
- Burger, K., Fahrenholz, F. and Gimpl, G. (1999). Non-genomic effects of progesterone on the signaling function on G protein-coupled receptors. *FEBS Letters* 464, 25–29.
- Cabrera-Muñoz, E., González-Arenas, A., Saqui-Salces, M., Camacho, J., Larrea, F., García-Becerra, R., and Camacho-Arroyo, I. (2009). Regulation of progesterone receptor isoforms content in human astrocytoma cell lines. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 113, 80–84.
- Cabrera-Muñoz, E., Hernández-Hernández, O. T., and Camacho-Arroyo, I. (2011). Role of progesterone in human astrocytomas growth. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 11, 1663–1667.
- Cadepond, F., Ulmann, a, and Baulieu, E. E. (1997). RU486 (mifepristone): mechanisms of action and clinical uses. *Annual Review of Medicine* 48, 129–156.

- Camacho-Arroyo, I., Pasapera, A. M., Pérez-Palacios, G., and Cerbón, M. A. (1995). Progesterone and its metabolites in central nervous system function. *Revista de investigación clínica* 47, 329–340.
- Camacho-Arroyo, I., González-Agüero, G., Gamboa-Domínguez, A., Cerbón, M. A., and Ondarza, R. (2000). Progesterone receptor isoforms expression pattern in human chordomas. *Journal of Neuro-Oncology* 49, 1–7.
- Camacho-Arroyo, I., González-Arenas, A., González-Agüero, G., Guerra-Araiza, C., and González-Morán, G. (2003). Changes in the content of progesterone receptor isoforms and estrogen receptor alpha in the chick brain during embryonic development. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology* 136, 447–452.
- Camacho-Arroyo, I., and Rodríguez-Dorantes, M. (2006). Transcriptional activity regulated by progesterone receptor isoforms. In *Molecular Endocrinology (India: Research signpost)*, pp. 25–38.
- Camacho-Arroyo, I., González-Arenas, A., and González-Morán, G. (2007). Ontogenic variations in the content and distribution of progesterone receptor isoforms in the reproductive tract and brain of chicks. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology* 146, 644–652.
- Chwalisz, K., Brenner, R. M., Fuhrmann, U. U., Hess-Stumpp, H., and Elger, W. (2000). Antiproliferative effects of progesterone antagonists and progesterone receptor modulators on the endometrium. *Steroids* 65, 741–751.
- Conneely, O. M., and Lydon, J. P. (2000). Progesterone receptors in reproduction: functional impact of the A and B isoforms. *Steroids* 65, 571–577.

- Diaz, J., Aranda, E., Henriquez, S. P., Quezada, M., Espinoza, E., Bravo, M. L., Oliva, B., Lange, S., Villalon, M., Jones, M., et al. (2012). Progesterone promotes focal adhesion formation and migration in breast cancer cells through induction of protease-activated receptor 1. *The Journal of Endocrinology* 214(2), 165–175.
- Edwards, D. P., Altmann, M., DeMarzo, a, Zhang, Y., Weigel, N. L., and Beck, C. A. (1995). Progesterone receptor and the mechanism of action of progesterone antagonists. *The Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 53, 449–458.
- Epstein Shochet, G., Tartakover Matalon, S., Drucker, L., Pomeranz, M., Fishman, A., Rashid, G., Oron-Karni, V., Pasmanik-Chor, M., and Lishner, M. (2012). Hormone-dependent placental manipulation of breast cancer cell migration. *Human Reproduction* 27, 73–88.
- Ganong, W. (2006). In *Fisiología médica (México: El Manual Moderno)*, pp. 387- 425.
- Giangrande, P. H., and McDonnell, D. P. (1999). The A and B isoforms of the human progesterone receptor: two functionally different transcription factors encoded by a single gene. *Recent progress in hormone research* 54, 291–313.
- González-Agüero, G., Ondarza, R., Gamboa-Domínguez, A., Cerbón, M. A., and Camacho-Arroyo, I. (2001). Progesterone receptor isoforms expression pattern in human astrocytomas. *Brain Research Bulletin* 56, 43–48.
- González-Agüero, G., Gutiérrez, A. A., González-Espinosa, D., Solano, J. D., Morales, R., González-Arenas, A., Cabrera-Muñoz, E., and Camacho-Arroyo, I. (2007). Progesterone effects on cell growth of U373 and D54 human astrocytoma cell lines. *Endocrine* 32, 129–135.

- González-Arenas, A., Villamar-Cruz, O., Guerra-Araiza, C., and Camacho-Arroyo, I. (2003). Regulation of progesterone receptor isoforms expression by sex steroids in the rat lung. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 85, 25–31.
- Graham, J. D., and Clarke, C. L. (1997). Physiological action of progesterone in target tissues. *Endocrine Reviews* 18, 502–519.
- Guerra-Araiza, C., and Camacho-Arroyo, I. (2000). Progesterone receptor isoforms: function and regulation. *Revista de investigación clínica* 52, 686–691.
- Guiochon-Mantel, A. (2000). Structure of the progesterone receptor and mode of action of progesterone. In *Progestins and Antiprogestins in Clinical Practice*, R. Sitruk-Ware and D. Mishell, eds. (Marcel Dekker), pp. 1 - 13.
- Hernández-Hernández, O. T., Rodríguez-Dorantes, M., González-Arenas, A., and Camacho-Arroyo, I. (2010). Progesterone and estradiol effects on SRC-1 and SRC-3 expression in human astrocytoma cell lines. *Endocrine* 37, 194–200.
- Hovland, A. R., Powell, R. L., Takimoto, G. S., Tung, L., and Horwitz, K. B. (1998). An N-terminal inhibitory function, IF, suppresses transcription by the A-isoform but not the B-isoform of human progesterone receptors. *The Journal of Biological Chemistry* 273, 5455–5460.
- Inoue, T. (2002). Progesterone Production and Actions in the Human Central Nervous System and Neurogenic Tumors. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 87, 5325–5331.
- Klijn, J. G., Setyono-Han, B., and Foekens, J. a (2000). Progesterone antagonists and progesterone receptor modulators in the treatment of breast cancer. *Steroids* 65, 825–830.

- Laws, E. R., Goldberg, W. J., and Bernstein, J. J. (1993). Migration of human malignant astrocytoma cells in the mammalian brain: Scherer revisited. *International Journal of Developmental Neuroscience* 11, 691–697.
- Louis, D. N., Ohgaki, H., Wiestler, O. D. and Cavenee, W. K. (2007). WHO Classification of tumours of the central nervous system (Lyon: IARC).
- Mahajan, D. K., and London, S. N. (1997). Mifepristone (RU486): a review. *Fertility and Sterility* 68, 967–976.
- Miller, H. M., Foxcroft, G. R., Squires, J. and Aherne, F. X. (1999). The effects of feed intake and body fatness on progesterone metabolism in ovariectomized gilts. *Journal of Animal Science* 77, 3253–3261.
- Misrahi, M., Venencie, P. Y., Saugier-veber, P., Sar, S., Dessen, P., and Milgrom, E. (1993). Structure of the human progesterone receptor gene. *Biochimica et Biophysica Acta* 1216, 289–292.
- Murphy, A. A., Zhou, M. H., Malkapuram, S., Santanam, N., Parthasarathy, S., and Sidell, N. (2000). RU486-induced growth inhibition of human endometrial cells. *Fertility and Sterility* 74, 1014–1019.
- Murphy, L. C., Murphy, L. J., and Shiu, R. P. (1988). Progestin regulation of EGF-receptor mRNA accumulation in T-47D human breast cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 150, 192–196.
- Musgrove, E. A., Lee, C. S., and Sutherland, R. L. (1991). Progestins both stimulate and inhibit breast cancer cell cycle progression while increasing expression of transforming growth factor alpha, epidermal growth factor receptor, c-fos, and c-myc genes. *Molecular and Cellular Biology* 11, 5032–5043.
- Musgrove, E. A., Hamilton, J. A., Lee, C. S., Sweeney, K. J., Watts, C. K., and Sutherland, R. L. (1993). Growth factor, steroid, and steroid antagonist regulation of cyclin gene expression associated with changes in T-47D

- human breast cancer cell cycle progression. *Molecular and Cellular Biology* 13, 3577–3587.
- Osoba, D., Brada, M., Yung, W. K., and Prados, M. D. (2000). Health-related quality of life in patients with anaplastic astrocytoma during treatment with temozolomide. *European Journal of Cancer* 36, 1788–1795.
- Parthasarathy, S., Morales, a J., and Murphy, A. A. (1994). Antioxidant: a new role for RU-486 and related compounds. *The Journal of Clinical Investigation* 94, 1990–1995.
- Prieto, G., Saqui-Salces, M., Almaraz-Nieves, A., Villamar-Cruz, O., Néri-Gomez, T., Camacho-Arroyo, I., Hernández-Molina, V. I., and Valdez Rodríguez, H. (2003). ¿Cómo actúan las hormonas esteroides? *Educación Química* 14, 196–201.
- Raaijmakers, H. C. A., Versteegh, J. E., and Uitdehaag, J. C. M. (2009). The X-ray structure of RU486 bound to the progesterone receptor in a destabilized agonistic conformation. *The Journal of Biological Chemistry* 284, 19572–19579.
- Ramaswamy, R., Ashton, K., Lea, R., Roberts, P., Davis, C. H., Golash, A., and Dawson, T. (2012). Study of effectiveness of mifepristone for glioma cell line growth suppression. *British Journal of Neurosurgery* 26, 336–339.
- Rousseau-Merck, M. F., Misrahi, M., Loosfelt, H., Milgrom, E., and Berger, R. (1987). Localization of the human progesterone receptor gene to chromosome 11q22-q23. *Human Genetics* 77, 280–282.
- Sarkar, C., Jain, A., and Suri, V. (2009). Current concepts in the pathology and genetics of gliomas. *Indian Journal of Cancer* 46, 108–119.
- Sauvageot, C. M., Kesari, S., and Stiles, C. D. (2007). Molecular pathogenesis of adult brain tumors and the role of stem cells. *Neurologic Clinics* 25, 891–924.

- 
- Schumacher, M., Hussain, R., Gago, N., Oudinet, J.-P., Mattern, C., and Ghomari, A. M. (2012). Progesterone synthesis in the nervous system: implications for myelination and myelin repair. *Frontiers in Neuroscience* 6, 1–22.
- Skildum, A., Faivre, E., and Lange, C. a (2005). Progesterone receptors induce cell cycle progression via activation of mitogen-activated protein kinases. *Molecular Endocrinology* 19, 327–339.
- Suzuki, T., Sasano, H., Kimura, N., Tamura, M., Fukaya, T., Yajima, A., and Nagura, H. (1994). Immunohistochemical distribution of progesterone, androgen and oestrogen receptors in the human ovary during the menstrual cycle: relationship to expression of steroidogenic enzymes. *Human Reproduction* 9, 1589–1595.
- Tihan, T., and Bloomer, M. M. (2010). Astrocytic neoplasms of the central nervous system and orbit: a morphologic perspective. *Seminars in Diagnostic Pathology* 27, 114–121.
- Tung, L., Mohamed, M. K., Hoeffler, J. P., Takimoto, G. S., and Horwitz, K. B. (1993). Antagonist-occupied human progesterone B-receptors activate transcription without binding to progesterone response elements and are dominantly inhibited by A-receptors. *Molecular Endocrinology* 7, 1256–1265.
- Vegeto, E., Shahbaz, M. M., Wen, D. X., Goldman, M. E., O'Malley, B. W., and McDonnell, D. P. (1993). Human progesterone receptor A form is a cell- and promoter-specific repressor of human progesterone receptor B function. *Molecular Endocrinology* 7, 1244–1255.
- Wong, M. S., and Murphy, L. C. (1991). Differential regulation of c-myc by progestins and antiestrogens in T-47D human breast cancer cells. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 39, 39–44.