



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

DOCTORADO
en
CIENCIAS
BIOMÉDICAS

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PARTICIPACIÓN DE SRC-1 Y DEL RECEPTOR
INTRACELULAR A PROGESTERONA EN LA REGULACIÓN
TRANSCRIPCIONAL DE VEGF, EGFR Y CICLINA D1 EN
LÍNEAS CELULARES DE ASTROCITOMAS HUMANOS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A :

M. en C. OLIVIA TANIA HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ

Tutor: Dr. IGNACIO CAMACHO ARROYO



MÉXICO, D.F.

2012



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

La realización de la presente tesis fue posible gracias al apoyo económico brindado por el CEP (UNAM) y por la DGAPA, UNAM (Proyecto PAPIIT: IN212611), bajo la dirección del Dr. Ignacio Camacho Arroyo en el Departamento de Biología de la Facultad de Química.

AGRADECIMIENTOS

Dr. Ignacio Camacho Arroyo

Dra. Cristina Fernández Mejía

Dr. Iván Velasco Velázquez

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Dra. Selva Rivas Arancibia

VOCAL: Dr. Ignacio Camacho Arroyo

SECRETARIO: Dr. Julio Morán Andrade

1er. SUPLENTE: Dr. Mauricio Rodríguez Dorantes

2° SUPLENTE: Dra. Elizabeth Langley McCarron

INDICE

1. Abstract	1
2. Resumen	2
3. Introducción	4
4. Antecedentes	5
4.1. Astrocitomas	5
4.2. Estructura y funciones de la progesterona (P)	9
4.2.1. Antagonistas de P	12
4.3. Receptor a progesterona (RP)	13
4.3.1. Características y función del RP	13
4.3.2. Isoformas del RP	16
4.4. Mecanismos de acción de la P	18
4.5. Coactivador de receptores a hormonas esteroides 1 (SRC-1)	21
4.6. P y astrocitomas	26
4.7. Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)	27
4.8. Receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR)	31
4.9. Ciclina D1	35
4.10. Efecto de la P en la expresión de VEGF, EGFR y Ciclina D1	37
5. Planteamiento del problema	40
6. Hipótesis	40
7. Objetivos	41
7.1. Objetivo general	41
7.2. Objetivos particulares	41
8. Metodología	42
8.1. Cultivo celular	42
8.2. Sincronización de las líneas celulares	42
8.3. Extracción de RNA total	43
8.4. RT-PCR	44
8.4.1. Oligonucleótidos	44

8.4.2. Síntesis de DNA complementario (cDNA)	45
8.4.3. PCR	45
8.5. Extracción de proteínas totales	46
8.6. Western blot	47
8.7. Transfección en la línea celular D54	48
8.8. Análisis densitométrico y estadístico	49
9. Resultados	50
10. Discusión	57
11. Conclusiones	64
12. Referencias	65
13. Anexo	78
13.1. Línea celular D54 transfectada con pmaxGFP-FUGENE	78
13.2. Publicaciones	79
13.2.1. Progesterone receptor and SRC-1 participate in the regulation of VEGF, EGFR and Cyclin D1 expression in human astrocytoma cell lines	79
13.2.2. Role of Progesterone in human astrocytomas growth	87

1. ABSTRACT

Astrocytomas are the most common primary brain tumors in humans. It has been reported that vascular endothelial growth factor (VEGF), epidermal growth factor receptor (EGFR), cyclin D1 and progesterone receptor (PR) expression levels are elevated in patients with high-grade astrocytomas. Progesterone (P) regulates astrocytoma growth through its interaction with PR, which recruits coregulatory proteins, such as steroid receptor coactivator-1 (SRC-1), that are required for efficient transcriptional activation. The regulation of VEGF, EGFR and cyclin D1 expression by P in human astrocytoma cells is not known. We studied the role of PR and SRC-1 in the expression of VEGF, EGFR and cyclin D1 mediated by P in human astrocytoma cell lines grade III (U373) and IV (D54). P significantly increased VEGF and EGFR mRNA expression after 12 h of treatment in D54 cells, and this was reflected at protein level 24 h after treatment. This effect was blocked by the PR antagonist, RU486. In U373 cells, cyclin D1 mRNA and protein expression were induced by P after 6 and 8 h of treatment, respectively, and this effect was blocked with RU486. Transfection with short hairpin RNA targeting coactivator SRC-1 significantly reduced VEGF expression after 24 h of treatment. Collectively, our results indicate that P regulates VEGF and EGFR expression in D54 cells and cyclin D1 expression in U373 through PR, and that SRC-1 participates in the regulation of VEGF expression.

2. RESUMEN

La progesterona (P) es una hormona esteroide secretada principalmente por los ovarios. Sus principales órganos blanco son el útero, la glándula mamaria y el cerebro. Esta hormona es fundamental en la regulación de la reproducción, además, participa en la regulación de muy diversos procesos no asociados a la reproducción. Aunque la P ejerce 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), el cual puede reclutar al coactivador de receptores a hormonas esteroideas 1 (SRC-1) de manera dependiente del ligando facilitando el proceso de transcripción.

Se sabe que la P puede participar en el proceso de tumorigénesis en diversos tejidos y se ha propuesto que puede regular el crecimiento de los astrocitomas, que son los tumores cerebrales más frecuentes y agresivos en el ser humano. Los astrocitomas presentan alteraciones en la expresión de genes como ciclina D1 que participa en el control del ciclo celular, el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) que promueve la proliferación celular y en el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) que promueve la angiogénesis.

Se ha reportado que la expresión de VEGF, EGFR y ciclina D1 es regulada por P, pero se desconoce si regula la expresión de VEGF, EGFR y ciclina D1 mediante el RP y SRC-1 en astrocitomas humanos.

En el presente trabajo se determinó la participación del RP y de SRC-1 en la regulación de la expresión de VEGF, EGFR y ciclina D1 en las líneas celulares de astrocitomas humanos U373 y D54 (grados III y IV de evolución, respectivamente).

En la línea celular D54, el tratamiento con P durante 12 h aumentó significativamente la expresión del mRNA de VEGF y EGFR. El contenido de la proteína de VEGF y EGFR aumentó con P a las 24 h. Estos efectos fueron revertidos por el antagonista del RP, RU486. Por otro lado, la P no mostró un efecto sobre la expresión de los dos genes en la línea celular U373.

En la línea celular U373, la expresión del mRNA y de la proteína de ciclina D1 incrementó significativamente con el tratamiento de P a las 6 y 8 h

respectivamente, este efecto fue bloqueado por el RU486. La transfección de RNA tallo asa corta (short hairpin: shRNA) contra SRC-1 (shSRC-1) significativamente redujo el contenido de la proteína de VEGF después de 24 h de tratamiento con P en las células D54. Estos datos sugieren que la P regula diferencialmente la expresión de VEGF, EGFR y ciclina D1 mediante el RP en líneas celulares de astrocitomas humanos y que SRC-1 participa en la regulación de la expresión de VEGF.

3. INTRODUCCIÓN

Los tumores derivados de células gliales tienen una incidencia de 6.5 casos por cada 100,000 personas por año. Los astrocitomas representan el 40-50% de todos los tumores del sistema nervioso central (SNC) y hasta 70% de los tumores gliales. El astrocitoma anaplásico (AA) y el glioblastoma multiforme (GBM) (grados III y IV) son las variantes más malignas y frecuentes de los tumores astrocíticos (30 y 50% de frecuencia respectivamente). El pronóstico de los pacientes con astrocitomas depende del grado de malignidad del tumor, localización y tamaño; sin embargo, el tiempo de supervivencia de los pacientes con diagnóstico de gliomas astrocíticos de alta malignidad es corto. Estas lesiones son generalmente incurables y, a pesar de los tratamientos y terapias existentes, dentro de los primeros 2 años después del diagnóstico, el 90% de los pacientes fallece (Pérez *et al.*, 2001).

Se han encontrado diversos factores asociados con el desarrollo y evolución en el grado de malignidad de los astrocitomas (Sarkar *et al.*, 2009b). Existen reportes que sugieren que la progesterona (P), puede participar en el crecimiento de los astrocitomas (Camacho-Arroyo *et al.*, 2000; González-Agüero *et al.*, 2007; González-Agüero *et al.*, 2001). Además, existe evidencia que indica que la P regula la expresión de ciertos genes, como VEGF, EGFR y ciclina D1 (Boonyaratanakornkit *et al.*, 2008; Liang *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2007), los cuales, se encuentran implicados en el desarrollo y progresión de los astrocitomas (Furnari *et al.*, 2007).

Aunque, se ha establecido que la P induce la expresión de VEGF, EGFR y ciclina D1 en líneas celulares de cáncer de mama mediante el RP y que SRC-1 regula la actividad transcripcional del RP aumentándola, se desconoce si la P regula la expresión de VEGF, EGFR y ciclina D1 mediante el RP y SRC-1 en astrocitomas humanos. Por lo que en este trabajo se determinará la participación del RP y de SRC-1 en la regulación de la expresión de VEGF, EGFR y ciclina D1 en las líneas celulares de astrocitomas humanos de grado III (U373) y IV (D54).

4. ANTECEDENTES

4.1. Astrocitomas

Los astrocitomas son tumores neuroepiteliales que se originan de los astrocitos, los cuales son uno de los varios tipos de células gliales, por lo que, un astrocitoma es un tipo de glioma (Badash, 2009; Daumas-Duport *et al.*, 1988). Los astrocitomas son las neoplasias cerebrales primarias más comunes en humanos, al constituir el 45% de todos los tumores del Sistema Nervioso Central (Daumas-Duport *et al.*, 1988).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) clasifica a los astrocitomas según sus características histológicas (presencia de atipia, proporción de células en mitosis, proliferación endotelial y necrosis), su capacidad de invasión y progresión, en cuatro grados de malignidad, siendo los de grado I biológicamente menos agresivos y los de grado IV aquellos de mayor agresividad:

- Grado I (Astrocitoma pilocítico)

Los astrocitomas pilocíticos son relativamente delimitados, de lento crecimiento y se presentan principalmente en niños y adultos jóvenes. Afectan más comúnmente al cerebelo, seguido por el hipotálamo, nervio y quiasma ópticos, tálamo, ganglios basales, tallo cerebral y hemisferios cerebrales. Histológicamente se caracterizan por un patrón bifásico de tejidos compacto y laxo. Las zonas compactas consisten de densos agregados de astrocitos bipolares alargados, mientras que las áreas esponjosas consisten de astrocitos multipolares redondos en asociación con microquistes y gránulos eosinofílicos. En ocasiones puede observarse proliferación vascular glomerular, sin embargo, no es considerada como una señal de malignidad. Las células que componen al astrocitoma presentan fuerte inmunopositividad a la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) (Sarkar *et al.*, 2009a). Estos tumores usualmente pueden ser eliminados mediante resección quirúrgica (total o parcial) y/o radio/quimioterapia (Bristol, 2009).

- Grado II (Astrocitoma difuso)

Los astrocitomas difusos o infiltrantes afectan comúnmente a adultos entre 30 y 40 años de edad. Estos tumores están caracterizados por un alto grado de diferenciación, lento crecimiento celular y bordes no definidos, pero con una tendencia intrínseca para la progresión a astrocitomas anaplásicos y en el peor de los casos a glioblastomas. Se presentan comúnmente en los hemisferios cerebrales, seguidos por el tallo cerebral y la médula espinal. Histológicamente, se observa en éstos un moderado incremento celular, se observan astrocitos bien diferenciados y con atipia nuclear ocasional. En los astrocitomas de grado II se observa una baja proporción de células con actividad mitótica y proliferación endotelial, además de no presentar necrosis. La inmunorreactividad a GFAP es en general alta. Usualmente son positivos también a otras dos proteínas, vimentina y S-100, aunque tienen poca relevancia en su diagnóstico (Sarkar *et al.*, 2009a). El tratamiento puede incluir resección quirúrgica (aunque en mucho menor medida que en los astrocitomas grado I debido a su capacidad de infiltrarse), quimioterapia y/o radioterapia (Bristol, 2009). En general, la media de sobrevivencia de los pacientes es de 5 años (Louis *et al.*, 2007).

- Grado III (Astrocitoma anaplásico)

De forma similar a los astrocitomas difusamente infiltrantes, los astrocitomas anaplásicos están preferencialmente localizados en los hemisferios cerebrales y usualmente afectan a adultos de entre 40 y 60 años de edad. Están histológicamente caracterizados por atipia nuclear, aumento celular y actividad proliferativa significativa. Señales adicionales de neoplasia incluyen células tumorales multinucleadas con anomalías en la mitosis y positivas a GFAP. Los astrocitomas anaplásicos son el grado de astrocitoma más común y tienden a progresar a tumores grado IV en tiempos cortos (Sarkar *et al.*, 2009a). El tratamiento inicial estándar incluye, la máxima remoción posible del tumor sin causar deficiencias neurológicas (en la mayoría de los casos resulta muy poco efectiva), radioterapia y/o quimioterapia (Buckner *et al.*, 2007). El tiempo de sobrevivencia de los pacientes con esta patología es de 2-3 años (Louis *et al.*, 2007).

- Grado IV (Glioblastoma multiforme)

El glioblastoma multiforme (GBM) es el tumor primario del SNC de mayor frecuencia y malignidad. Comúnmente se presentan en adultos entre las edades de 45 a 70 años (Daumas-Duport et al., 1988) y de forma preferencial en los hemisferios cerebrales (Sarkar et al., 2009), ganglios basales y tálamo. Estos tumores llegan a medir hasta 5 cm, microscópicamente son altamente anaplásicos y pueden estar compuestos de células de diversas morfologías. Algunos de estos tipos celulares tienen una morfología de estrella diferenciada y expresión de marcadores característicos como GFAP y S-100, mientras que otras de las células presentes son desdiferenciadas mezcladas con elementos estromales tales como astrocitos reactivos (caracterizados por hipertrofia y regulación a la alta de varias moléculas, incluyendo GFAP y S-100), microglía y otros infiltrados inmunes (Hadjipanayis *et al.*, 2009). La atipia nuclear en estas células es muy evidente y la gran actividad mitótica, incluyendo formas atípicas, es una característica prominente. La presencia de proliferación microvascular atípica (debida a secreción de factores estimulantes de formación de vasos sanguíneos) y/o necrosis es esencial para su diagnóstico.

Los glioblastomas pueden desarrollarse por progresión a partir de gliomas de menor malignidad (“glioblastoma secundario”) o desarrollarse de novo, es decir, sin evidencia de una lesión previa de menor malignidad (“glioblastoma primario”), los cuales representan aproximadamente el 90% de los casos (Furnari et al., 2007). Morfológicamente, los glioblastomas primarios y secundarios son indistinguibles entre ellos. Clínicamente, los glioblastomas secundarios tienden a ocurrir en pacientes jóvenes (con una media de 45-50 años), mientras que los glioblastomas primarios ocurren mayormente en pacientes de edades más tardías (Sarkar et al., 2009). La sobrevivencia de los pacientes con GBM es corta, generalmente fallecen dentro del primer año después del diagnóstico (Louis et al., 2007). Estos tumores son muy resistentes a la radioterapia y quimioterapia y debido a su alta capacidad para infiltrarse, en especial al parénquima cerebral, generalmente no es posible realizar resección quirúrgica (Hadjipanayis et al., 2009).

En general, los primeros síntomas a causa de estos tumores pueden incluir: dolores de cabeza y vómito debido al aumento en la presión intracraneal, cambios visuales, ataques, cambios de personalidad, demencia o problemas con la memoria, el aprendizaje, la concentración y problemas motores. Los síntomas subsecuentes varían dependiendo de la localización del astrocitoma (Badash, 2009) y se ha reportado que la sobrevivencia de los pacientes está inversamente relacionada al grado del tumor (Daumas-Duport et al., 1988).

Las alteraciones más frecuentes que se encuentran en estos tipos tumorales son la pérdida de heterocigocidad, alteraciones en la función de p53/proteína de unión a p53 (MDM2)/ inhibidor de la cinasa 2B dependiente de ciclina (P14arf) y de cinasa 4 dependiente de ciclina (CDK4)/ gen del retinoblastoma (RBI)/ y del inhibidor de la cinasa 2A dependiente de ciclina (P16ink4) implicadas en división celular y la alteración en la expresión de genes como ciclina D1 que participa en el control del ciclo celular, el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) que promueve la proliferación celular y en el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) que promueve la angiogénesis (Ichimura *et al.*, 2004). Se ha observado que la expresión del mRNA y de la proteína de VEGF, EGFR y ciclina D1 es mayor en pacientes con astrocitomas grado IV comparada con los de bajo grado de evolución tumoral y que el aumento en la expresión de estos genes se ha correlacionado con alta proliferación celular y una menor sobrevivencia de los pacientes (Godard *et al.*, 2003; Sallinen *et al.*, 1999).

El tratamiento para los astrocitomas más agresivos es muy pobre, de modo que el cuidado médico radica principalmente en el manejo paliativo de los pacientes. Es por esto que en muchos casos se busca ofrecer a los pacientes tratamientos experimentales o alternativos (como ocurre con otros tipos de tumores) entre los que se encuentran quimioterapia intrarterial, inmunoterapia, terapia génica y tratamientos endócrinos (Edward *et al.*, 2005).

4.2. Estructura y funciones de la progesterona (P)

La P (4-pregnen-3,20-diona) es una hormona esteroide de 21 átomos de carbono derivada del colesterol; por lo que al igual que éste, contiene un núcleo de ciclopentanoperhidrofenantreno (Ganong, 2006). El primer paso en su biosíntesis corresponde a la conversión de colesterol en pregnenolona, reacción que tiene lugar en la mitocondria. Posteriormente, la pregnenolona pasa de la mitocondria al retículo endoplásmico liso donde es convertida en P (Figura 1) (Schumacher *et al.*, 2009).

La P es sintetizada y secretada por los ovarios (cuerpo lúteo y folículos), testículos, glándulas adrenales y placenta (Henley *et al.*, 2005). Además, puede ser sintetizada en el cerebro, médula espinal y nervios periféricos, ya sea *de novo* a partir del colesterol o a partir de pregnenolona circulante (Baulieu, 1999). En los vertebrados, la síntesis y secreción de P está regulada por otras hormonas, tales como la hormona folículo estimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH) (Henley *et al.*, 2005).

Cuando es metabolizada, la P es convertida a 5α -dihidroprogesterona (5α -DHP), metabolito que es susceptible a una reducción y es convertido a $3\alpha,5\alpha$ -tetrahydroprogesterona ($3\alpha,5\alpha$ -THP). Además, puede ser convertida a 20α -hidroxiprogestero, un metabolito con menor actividad biológica (Schumacher *et al.*, 2009).

Cerca del 2% de la P circulante está en su forma libre, mientras que 80% está unida con albúmina y 18% con globulina de unión a corticosteroides (Ganong, 2006; Westphal *et al.*, 1973). La P tiene una vida de 34.8-55.13 horas (Klein *et al.*, 2001) y en el hígado se convierte en pregnandiol, el cual se conjuga con ácido glucurónico y se excreta en la orina (Figura 2) (Ganong, 2006).

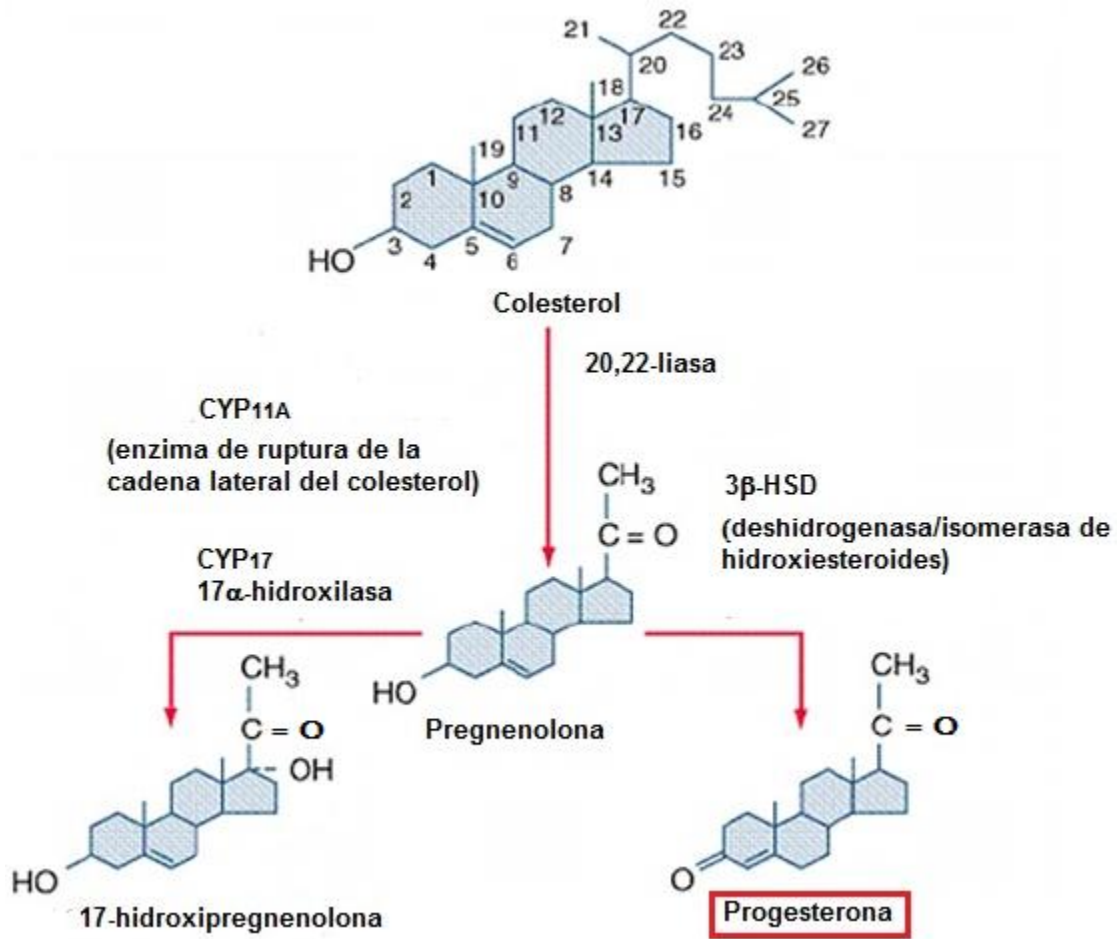


Figura 1. Biosíntesis de la P. Conversión de colesterol a pregnenolona por CYP11A (también llamada colesterol 20,22-desmolasa o P450scc) y de ésta a P por la enzima 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 β -HSD). La 3 β -HSD cataliza 2 reacciones: la deshidrogenación del grupo OH del carbono (C) 3 y la subsecuente isomerización del doble enlace entre el C5 y C6 a un doble enlace entre el C4 y C5 (Carr *et al.*, 2005).

En los hombres, la concentración plasmática de P es cercana a 300 pg/mL, mientras que en las mujeres, la concentración de P es mayor que en los hombres y cambia a lo largo del ciclo menstrual (Tabla 1), en el embarazo y en la menopausia (Ganong, 2006).

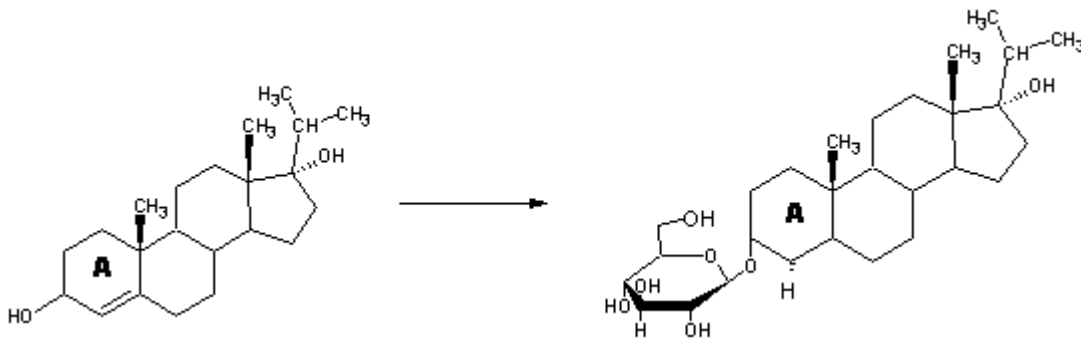


Figura 2. Formación de un glucurónido a partir de pregnandiol.

Tabla 1. Concentración plasmática de P en las diferentes etapas del ciclo menstrual.

Etapa	Progesterona (ng/mL)
Menstruación	0.1-500
Folicular	0.1-1
Ovulatoria	1-2
Lútea	4-15

La P se encuentra involucrada en la regulación de un amplio número de funciones en los mamíferos. Participa en procesos como la regulación de la ovulación, estimulación de la regeneración del estroma endometrial, mantenimiento del embarazo, desarrollo alveolar de la glándula mamaria como parte de la preparación para la lactancia (Graham *et al.*, 1997), ascenso de la temperatura basal en la ovulación (Ganong, 2006), estimulación de la respiración, conducta sexual, modulación de la masa ósea, regulación del sistema inmune, neuroprotección, reducción de la excitabilidad neuronal, memoria y aprendizaje, ciclo sueño-vigilia y en el crecimiento de diversos tumores (Camacho-Arroyo *et al.*, 2003).

4.2.1. Antagonistas de P

Los antagonistas de P pertenecen a la gran familia de ligandos del receptor a esta hormona esteroide. A partir del primer reporte acerca de la mifepristona (RU486), un antagonista de progestinas y glucocorticoides (Figura 3), numerosos ligandos relacionados a ésta han sido sintetizados, los cuales exhiben un amplio espectro en su rango de actividad, desde antagonistas de P puros hasta ligandos con actividad de agonista-antagonista (Spitz, 2003).

Inicialmente los antagonistas de P fueron divididos en antagonistas Tipo 1 y Tipo 2. Los antagonistas Tipo 1 fueron considerados como “puros” ya que antagonizan por completo la acción de su receptor, un ejemplo es la onapristona (ZK98299) (Figura 3). En contraste, los antagonistas Tipo 2, como el RU486, pueden incluso activar al receptor al que se unen de manera dependiente del tipo celular, el contexto del promotor y otras vías de señalización. Los compuestos con actividad de agonista-antagonista son actualmente conocidos como moduladores selectivos del receptor a progesterona (SPRMs) o como agonistas-antagonistas parciales (Spitz, 2003).

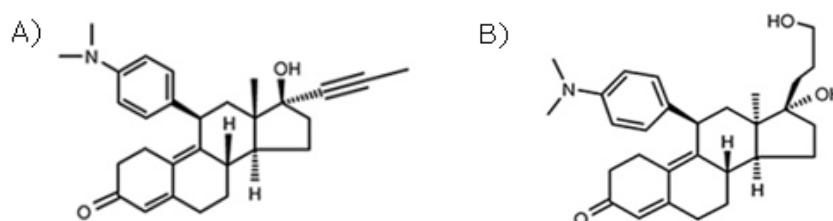


Figura 3. Estructura química de dos antagonistas de P. A) RU486 (Mifepristona). La estructura muestra sustituciones en las posiciones 11 y 17 que son características de antiprogestinas esteroideas. B) ZK98299 (Onapristona) (Leonhardt *et al.*, 2002; Raaijmakers *et al.*, 2009).

Se sabe que el RU486 compite con la P por el sitio de unión de ésta a su receptor intracelular (RP) y que se une al RP con una constante de afinidad media aproximada de $1.4 \text{ nM} \pm 0.6$ (Raaijmakers *et al.*, 2009). Aunque la activación del RP no se ve afectada al unirse el RU486, estudios con coactivadores de la familia

p160 y de la estructura del sitio de unión al ligando, han demostrado que el RU486 no se une a las mismas regiones que un agonista y que induce una conformación diferente de su extremo C-terminal (Leonhardt *et al.*, 2002). Esta conformación alterna no permite la interacción con coactivadores y promueve el reclutamiento de correpresores.

Los antagonistas de P tienen diversos efectos sobre el sistema reproductivo. Además pueden ser utilizados en el tratamiento de algunos tipos de cáncer, por ejemplo RU486 es utilizado en el tratamiento contra meningiomas y cáncer de mama (Spitz, 2003).

4.3. Receptor a progesterona (RP)

4.3.1. Características y función del RP

La mayoría de los efectos biológicos de la P están mediados a través del RP, el cual pertenece a la superfamilia de receptores nucleares cuyos miembros regulan la expresión de genes en respuesta a la unión con su ligando (Kastner *et al.*, 1990). En una gran variedad de especies, incluyendo aves, roedores, monos y humanos, el RP está expresado en dos isoformas: una larga denominada RP-B y una corta denominada RP-A (Guerra-Araiza *et al.*, 2000), con excepción del conejo en el cual sólo se ha detectado la isoforma RP-B (Loosfelt *et al.*, 1986). Ambas isoformas del RP son producto de un único gen, pero generadas a partir de diferentes sitios de inicio de la transcripción y reguladas por diferentes promotores. En el humano, este gen se encuentra localizado en el cromosoma 11q22-23 (Tetel *et al.*, 2009), tiene un tamaño aproximado de 90 kb y comprende 8 exones y 7 intrones (Misrahi *et al.*, 1993) que generan un mRNA de aproximadamente 3000 nucleótidos (Theveny *et al.*, 1987) el cual da origen a un polipéptido de 933 aminoácidos (Misrahi *et al.*, 1993) (Figura 4).

El RP tiene una estructura dividida en dominios funcionales que consiste en una región amino terminal (N-terminal), un dominio de unión al DNA (DBD), una

región de bisagra y una región carboxilo terminal (C-terminal) en donde se encuentra el dominio de unión al ligando (LBD). Al igual que la mayoría de los receptores a esteroides, tiene al menos dos funciones de activación de la transcripción (AF) (Figuras 4 y 5).

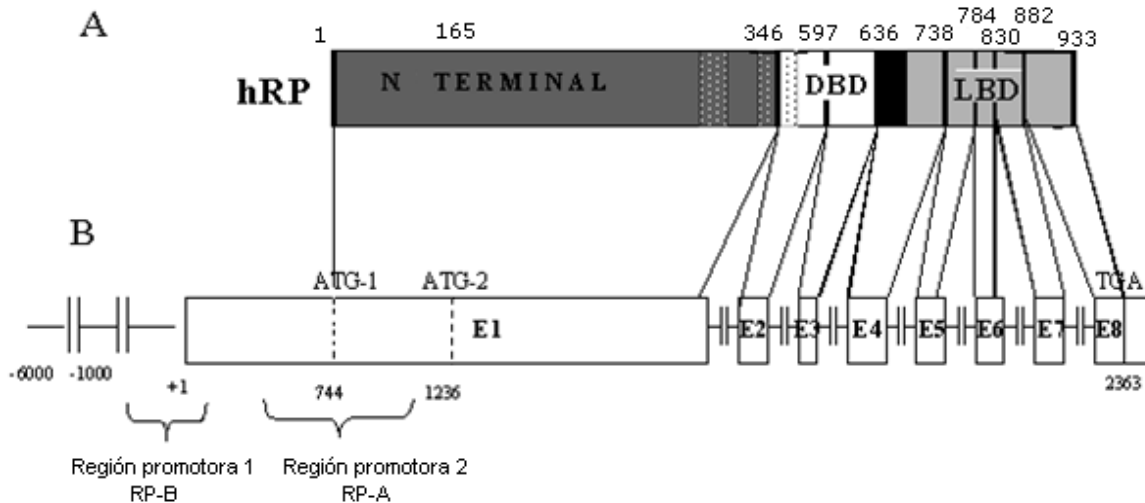


Figura 4. Representación esquemática de la estructura de la proteína y del gen del RP humano (hRP). A) Organización de los dominios del RP. La secuencia total de aminoácidos (933) se muestra dividida en cuatro dominios: en color gris oscuro el dominio amino terminal (N terminal), en blanco el dominio de unión al DNA (DBD), en negro la región de bisagra y señalado en gris claro el dominio de unión al ligando (LBD). B) Esquema del gen. Se muestra la localización de las dos regiones promotoras: la región promotora 1 se encuentra ubicada de la posición -711 a +31 y la región 2 en la posición +464 a +1105. Los exones están señalados con la letra “E” seguida del número correspondiente a cada exón. Los límites de los exones están proyectados con líneas rectas hacia el esquema de la estructura de la proteína en donde se representa su correspondencia con la posición y número de aminoácidos, los cuales están señalados con números en la parte superior. Los intrones están señalados como líneas interrumpidas (-|-) entre cada exón. Se señalan las 2 posiciones de inicio de la traducción (ATG) (ATG-1 a +744 y ATG-2 a +1236) y la posición de término (TGA) (Misrahi *et al.*, 1993).

El dominio N-terminal es el menos conservado entre los receptores nucleares, se codifica a partir del exón 1 y modula las interacciones intramoleculares e interacciones proteína-proteína. El DBD es la región más conservada, se codifica por los exones 2 y 3, consiste de dos motivos denominados “dedos de zinc”, elementos críticos para la activación de genes blanco, participa en su dimerización con otro RP y media la unión del receptor (unido a su ligando) a elementos de respuesta a progesterona (ERP). Los ERP, de manera general, consisten en secuencias consenso (palindrómicas o directamente repetidas) de seis nucleótidos que están separadas por un espaciador de tres nucleótidos. Adyacente al DBD se encuentra la región de bisagra, la cual se codifica a partir del exón 4, es importante para la apropiada dimerización del RP, participa en la estabilización del receptor mediante su unión con proteínas de choque térmico (Hsp) y contiene una secuencia de localización nuclear (NLS) (Figura 5). El LBD consiste de 10-12 α -hélices que forman un sitio hidrofóbico de unión al ligando y se codifica del exón 5 al exón 8 (Misrahi *et al.*, 1993; Tetel *et al.*, 2009).

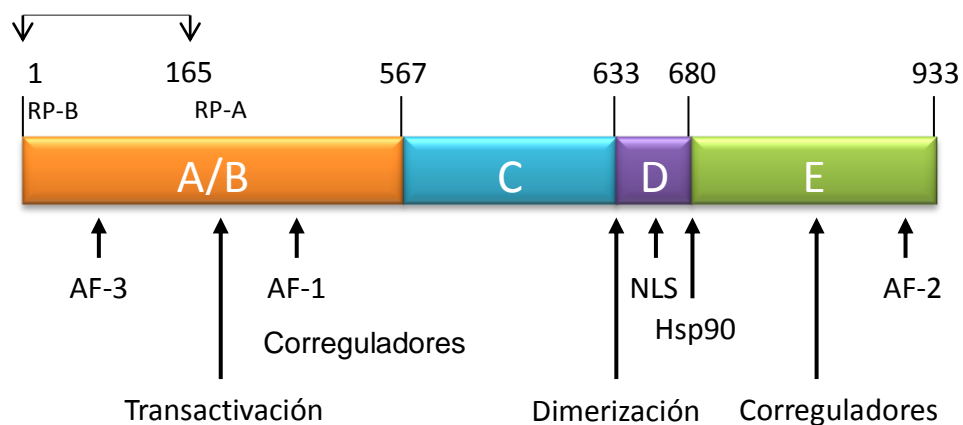


Figura 5. Esquema representativo de los dominios funcionales del RP (A-E). Los números indican las posiciones de los aminoácidos que delimitan el inicio y término de cada dominio, mientras que las flechas (↓) indican el sitio de inicio de la traducción de las dos isoformas. A/B: extremo N-terminal de la isoforma A/B, C: dominio de unión al DNA (DBD), D: región de bisagra, E: dominio de unión al ligando (LBD), AF: función de activación, NLS: señal de localización nuclear; Hsp: proteínas de choque térmico, (Camacho-Arroyo *et al.*, 2006).

4.3.2. Isoformas del RP

Se han identificado dos isoformas del RP, las cuales se denominan RP-A (80-94 kDa; en el humano, hRP: 94 kDa) y RP-B (108-120 kDa; en el humano, hRP: 114 kDa). RP-A carece de 164 aminoácidos en la región amino terminal, mientras que en RP-B sí están presentes (Figura 6). El RP-A posee solamente dos regiones con funciones de activación, mientras que el RP-B contiene además una tercera región (AF-3) presente en el extremo amino terminal (Figura 5). Además existe la presencia de una región con función inhibitoria localizada en la región adyacente a AF-1 que sólo es funcional en RP-A (Guerra-Araiza *et al.*, 2000). Estudios cinéticos indican que la constante de unión de la P por RP-A y RP-B es de 1.2 nM y 0.9 nM, respectivamente (Raaijmakers *et al.*, 2009).

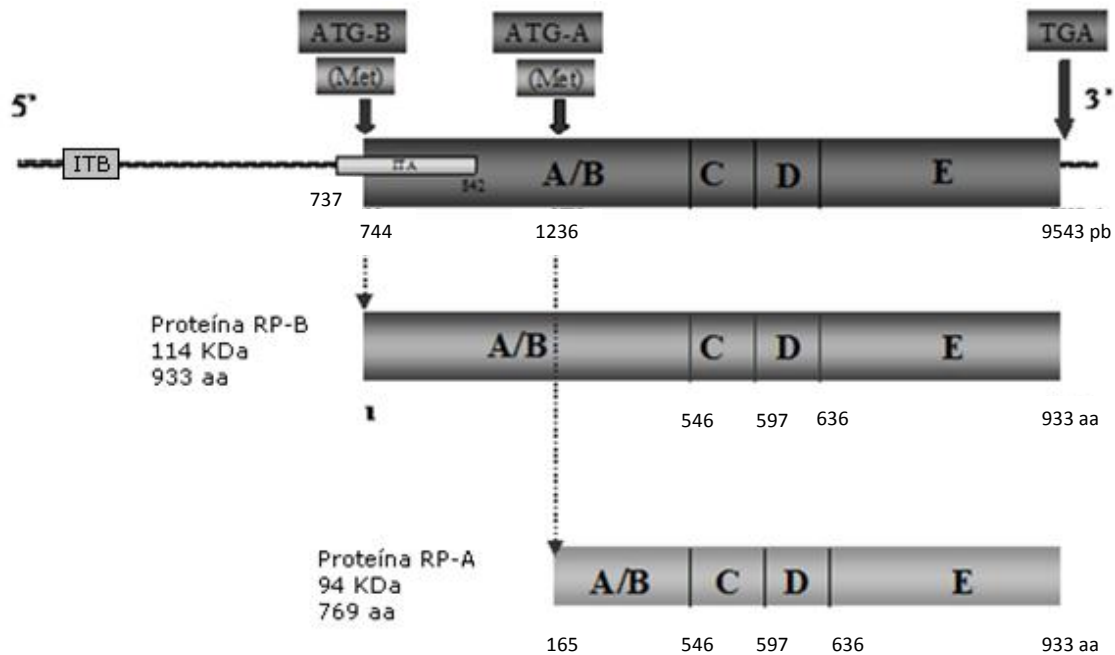


Figura 6. Esquema de la organización de las isoformas del hRP. Los números indican la posición de las bases en el gen y de los aminoácidos (aa) en las proteínas del receptor. A-E: dominios funcionales del RP, ITB: sitio de inicio de la transcripción de RP-B, ITA: sitio de inicio de la transcripción de RP-A, ATG-B: codón de inicio de la traducción de RP-B; ATG-A: codón de inicio de la traducción de RP-A, TGA: codón de término de la traducción.

En el ser humano, ambas isoformas del RP son codificadas por el mismo gen pero se transcriben a partir de la regulación de dos secuencias promotoras distintas que dan lugar a diferentes mRNA. Una secuencia es distal (de -711 a +31) (Figura 4) y corresponde a la secuencia promotora de RP-B, mientras que la otra es proximal (de +464 a +1105) (Figura 4) y corresponde a la secuencia promotora de RP-A, (Kastner *et al.*, 1990; Kraus *et al.*, 1993).

El RP tiene la capacidad de unirse al DNA como tres especies diméricas: AA, AB y BB. Se ha demostrado que la transcripción mediada por el RP no es igual cuando se forman homodímeros o heterodímeros e interactúan con agonistas y antagonistas (Leonhardt *et al.*, 1998).

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 la isoforma RP-B actúa como un activador transcripcional, mientras que el RP-A funciona como un fuerte represor de la actividad transcripcional, incluyendo a RP-B y otros receptores a hormonas esteroides (Clemm *et al.*, 1995; Sartorius *et al.*, 1994; Tung *et al.*, 1993; Vegeto *et al.*, 1993). Esta capacidad represora permite al RP-A mediar las acciones de la P al mismo tiempo que regula los efectos de otras hormonas, participando de forma importante en la integración de señales (*cross-talk*) mediadas por otros receptores a hormonas (Camacho-Arroyo *et al.*, 2006).

4.4. Mecanismos de acción de la P

Los mecanismos celulares mediante los cuales la P puede llevar a cabo sus efectos se dividen en dos: clásico o genómico y no clásico o no genómico (Bramley, 2003). El primer mecanismo involucra la interacción de la P con el RP, mientras que el segundo requiere la interacción de la P con receptores a P de siete dominios transmembranales, receptores a neurotransmisores, receptores de tipo tirosina cinasa y canales iónicos (Figura 7) (Camacho-Arroyo *et al.*, 2003; Camacho-Arroyo *et al.*, 2007).

El RP puede actuar como un activador de vías de señalización y como un factor de transcripción activado por su ligando regulando la expresión de genes blanco de la P (Boonyaratankornkit *et al.*, 2008). En general, en el mecanismo de acción del RP, la P atraviesa las membranas celulares por difusión simple debido a su 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 la disociación 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 como VEGF, EGFR y ciclina D1 (Figura 8) (Camacho-Arroyo *et al.*, 2006). También, se ha reportado que el RP se une indirectamente al DNA mediante la asociación con otros factores de transcripción, incluyendo a la proteína específica 1 (Sp1) y a la proteína activadora (AP1) para regular la transcripción de genes blanco de P que carecen de ERP en su región promotora (Lockwood *et al.*, 2000). El receptor activado unido al ligando puede reclutar corre reguladores, como los coactivadores de receptores a hormonas esteroides (SRC) que de manera dependiente de ligando facilitan el proceso de transcripción (McKenna *et al.*, 1999).

Mediante el mecanismo no genómico se modifica la conductancia iónica, la formación de segundos mensajeros y la activación de cascadas de fosforilación.

De esta manera la P puede regular diferentes funciones en sus órganos blanco a corto, mediano y largo plazo (Bramley, 2003).

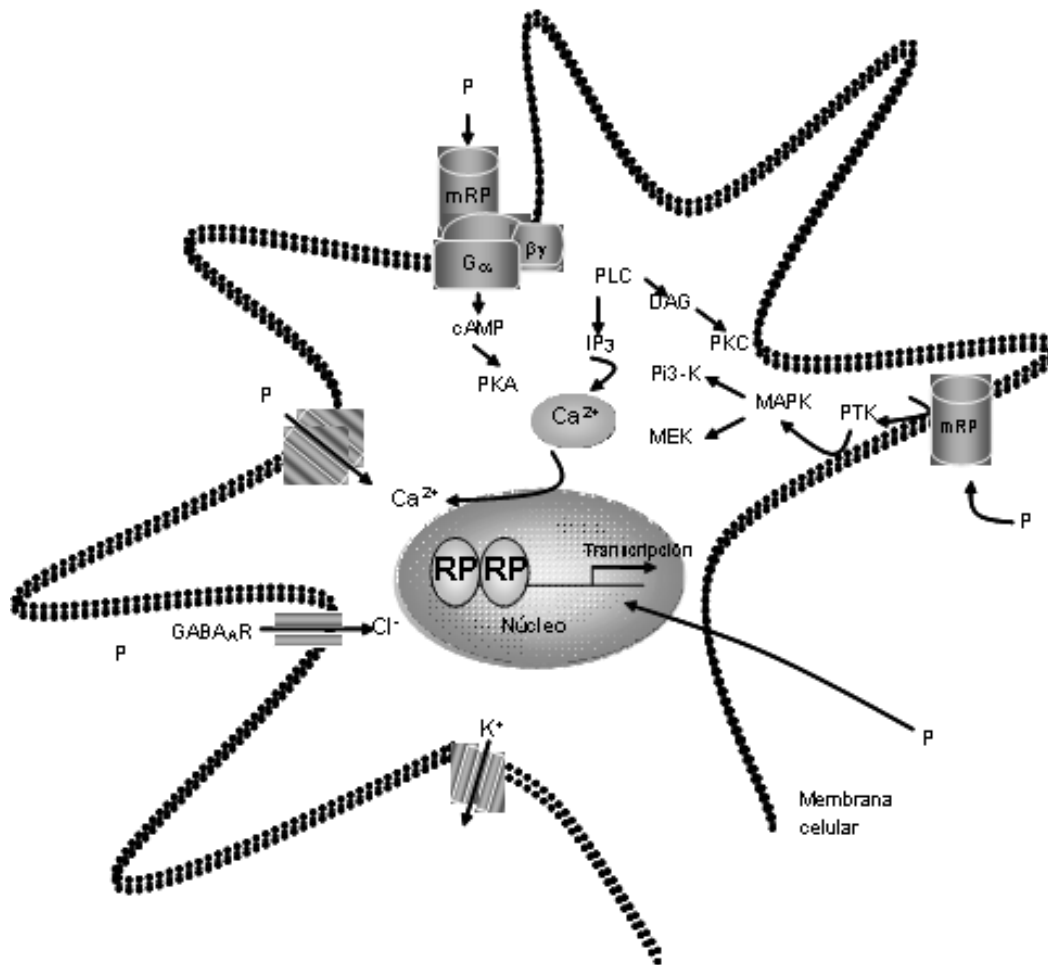


Figura 7. Esquema de los diferentes mecanismos de acción de la P. Los efectos de la P ocurren por dos diferentes mecanismos celulares: 1) a nivel membranar incluye receptores membranarles y canales iónicos, cuya activación inicia cascadas de señalización mediante la intervención de mensajeros intracelulares. mRP: Receptor membranar a P, G: Proteína G, αβγ: Subunidades de la proteína G, cAMP: Adenosín monofosfato cíclico, PKA: Proteína Cinasa A, GABA_AR: Receptor a GABA tipo A, Ca²⁺: Calcio, Cl⁻: Cloro, K⁺: Potasio, PTK: Proteína Tirocina Cinasa, MAPK: Proteína Cinasa Activada por Mitógeno, MEK: Cinasa de MAPK, PI3-K: Cinasa de Inositol Trifosfato, PLC: Fosfolipasa C, DAG: Diacil glicerol, PKC: Proteína Cinasa C, IP₃: Inositol Trifosfato 2) en el núcleo, donde el complejo hormona-receptor (P-RP) se une con ERP, ubicados en las regiones reguladoras de los genes blanco en el DNA, y así modulan directamente la expresión génica (Camacho-Arroyo *et al.*, 2003).

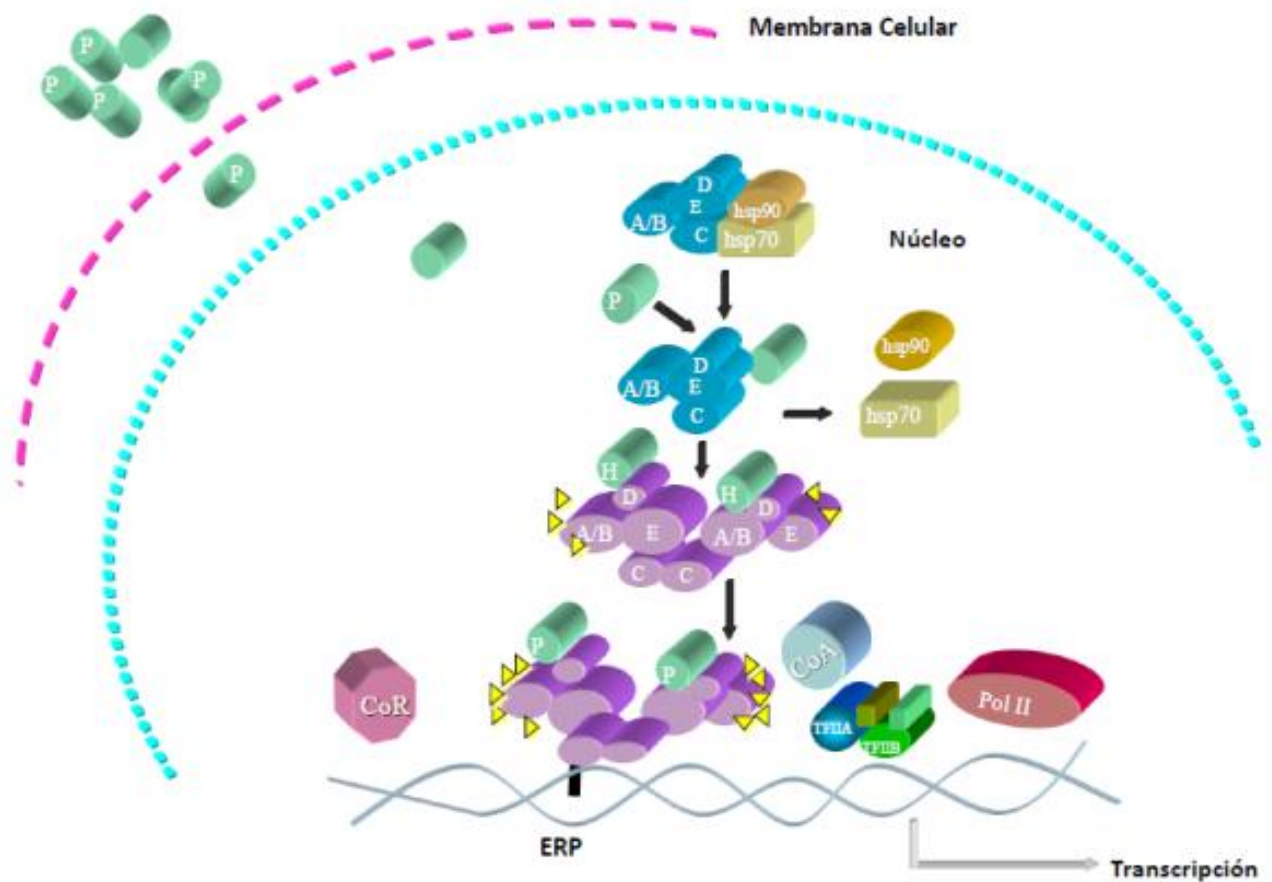


Figura 8. Mecanismo de acción genómico de la P. El RP (dominios A/B, C, D, E) se encuentra en un estado de inactivación, unido a proteínas de choque térmico (hsp). La P atraviesa la membrana plasmática y la envoltura nuclear, interactúa con su receptor, se liberan las hsp, el receptor se dimeriza, se une a elementos de respuesta a progesterona (ERP) y recluta a correguladores y a la maquinaria de transcripción basal (Cabrera-Muñoz *et al.*, 2011).

4.5. Coactivador de receptores a hormonas esteroides 1 (SRC-1)

Los coactivadores representan un grupo de proteínas que desempeñan sus funciones a través de interacciones proteína-proteína y por sus actividades enzimáticas, los coactivadores se unen a los receptores nucleares como el RP para potenciar su efecto en la transcripción de genes blanco, los coactivadores también pueden ser reclutados por la interacción con miembros de la familia de SRC (McKenna *et al.*, 1999).

Los coactivadores se asocian con los receptores nucleares de manera dependiente de ligando. Usualmente interactúan con la parte C-terminal de los receptores nucleares, a través de los dominios LXXLL (L es leucina y X cualquier aminoácido) presentes en los coactivadores, la unión también puede ocurrir en el N-terminal del receptor en AF-1, la cual representa una forma alternativa de interacción (McKenna *et al.*, 1999).

SRC-1 pertenece a la familia de los SRC la cual también incluye a SRC-2 y SRC-3. Los tres coactivadores presentan un peso molecular de aproximadamente 160 kDa y tienen un 40% de similitud en la secuencia completa (Xu *et al.*, 2003), y en pruebas de transfección *in vitro* se ha demostrado que pueden aumentar la actividad transcripcional de algunos receptores nucleares de forma similar, lo que puede sugerir una redundancia funcional entre los miembros de la familia de SRC (McKenna *et al.*, 1999), sin embargo, existe evidencia de que poseen diferentes funciones.

SRC-1 (también conocido como NCOA1) fue el primer coactivador para receptores a esteroides clonado y caracterizado (Onate *et al.*, 1995). SRC-1 interactúa y coactiva al RP, receptor a glucocorticoides (RG), receptor a estrógenos (RE), receptor a andrógenos (RA), receptor a hormonas tiroideas (RT) y receptor a ácido retinoico (RAR) en presencia de hormonas.

Los dominios funcionales de SRC-1 son: el dominio básico hélice-asa-hélice (bHLH), el dominio Per/ARNT/Sim (PAS: Per, proteína período involucrada en el ciclo circadiano de *Drosophila*; ARNT, translocador del receptor nuclear de aril hidrocarburo; Sim, proteína única de *Drosophila*) localizado en la región amino

terminal inicialmente identificado en *Drosophila*, está involucrado en homodimerización y la heterodimerización con proteínas que contienen estos dominios, éste es el dominio más conservado entre los 3 miembros de la familia SRC (McKenna *et al.*, 1999). El dominio bHLH/PAS también contiene una señal de localización nuclear la cual es importante para la importación y exportación de SRC-1 entre el núcleo y el citoplasma (Walsh *et al.* 2012). La región central contiene 3 motivos LXXLL, responsables de la interacción con los receptores nucleares (Leo *et al.*, 2000) (Figura 9).

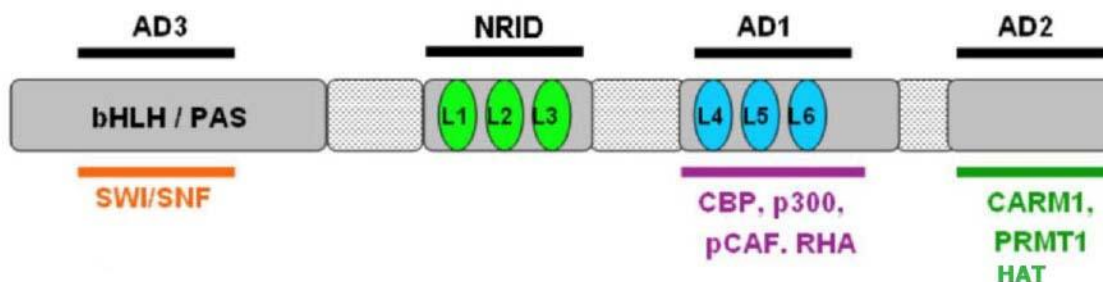


Figura 9. Dominios funcionales de SRC-1. En la región N-terminal se encuentra el dominio básico hélice-asa-hélice (bHLH), el dominio Per/ARNT/Sim (PAS: Per, proteína período involucrada en el ciclo circadiano de *Drosophila*; ARNT, translocador del receptor nuclear de aril hidrocarburo; Sim, proteína única de *Drosophila*) involucrado en la dimerización con otras proteínas, además, el dominio bHLH/PAS interactúa con coactivadores que poseen actividad de ATPasa como el complejo SWI/SNF. La región central de la proteína de SRC-1 tiene 3 motivos LXXLL, responsables de la interacción con los receptores nucleares (NRID). El dominio de activación 1 (AD1) está involucrado en la interacción con coactivadores como la proteína de unión a CREB (CBP), la proteína de 300 kDa (p300) y el factor asociado-p300/CBP (pCAF). AD1 tiene tres motivos LXXLL involucrados en la interacción con la maquinaria de transcripción basal y la RNA helicasa A (RHA). AD2 es responsable de reclutar coactivadores con actividad de histona metiltransferasa como la proteína arginina metiltransferasa 1 (PRMT1) y el coactivador asociado a arginina metiltransferasa 1 (CARM1), además, contiene actividad de histona acetiltransferasa (HAT).

Existen dos dominios de activación (AD1 y AD2), en donde, AD1 es responsable de la interacción con otros coactivadores como la proteína de unión a CREB (CBP), la proteína de 300 kDa (p300) y el factor asociado-p300/CBP (pCAF) que poseen actividad de histona acetiltransferasa (HAT), sin embargo, no interacciona con los receptores nucleares. El dominio AD1 tiene tres motivos LXXLL involucrados en la interacción con la maquinaria de transcripción basal, la RNA helicasa A y la RNA polimerasa II promoviendo la interacción de los receptores nucleares con la maquinaria de transcripción basal (Walsh *et al.* 2012). El dominio AD2 se localiza en la parte carboxilo terminal y es responsable de reclutar coactivadores con actividad de histona metiltransferasa como la proteína arginina metiltransferasa 1 (PRMT1) y el coactivador asociado a arginina metiltransferasa 1 (CARM1) (Xu *et al.*, 2003). Recientemente, un tercer dominio de activación (AD3) se ha identificado en el dominio bHLH/PAS; esta región también interactúa con coactivadores que poseen actividad de ATPasa como el complejo SWI/SNF (Johnson *et al.*), además, la región del carboxilo terminal de SRC-1 contiene actividad de HAT (Figura 9 y 10) (Xu *et al.*, 2009).

La actividad de HAT de SRC-1 modifica la estructura de la cromatina al interrumpir las interacciones iónicas entre las histonas cargadas positivamente y el ADN cargado negativamente, lo que permite el ensamblaje de la maquinaria de transcripción basal y de la RNA polimerasa II llevándose a cabo la transcripción (Figura 10) (McKenna *et al.*, 1999; Xu *et al.*, 2009).

SRC-1 es una proteína expresada en diferentes órganos, incluyendo, el pulmón, el corazón, el útero, la glándula mamaria, los testículos y el sistema nervioso (Walsh *et al.*; 2012, Xu *et al.*, 2009). En el sistema nervioso, SRC-1 es altamente expresado en el hipotálamo, hipocampo, cerebelo, tálamo y amígdala (Leo *et al.*, 2000).

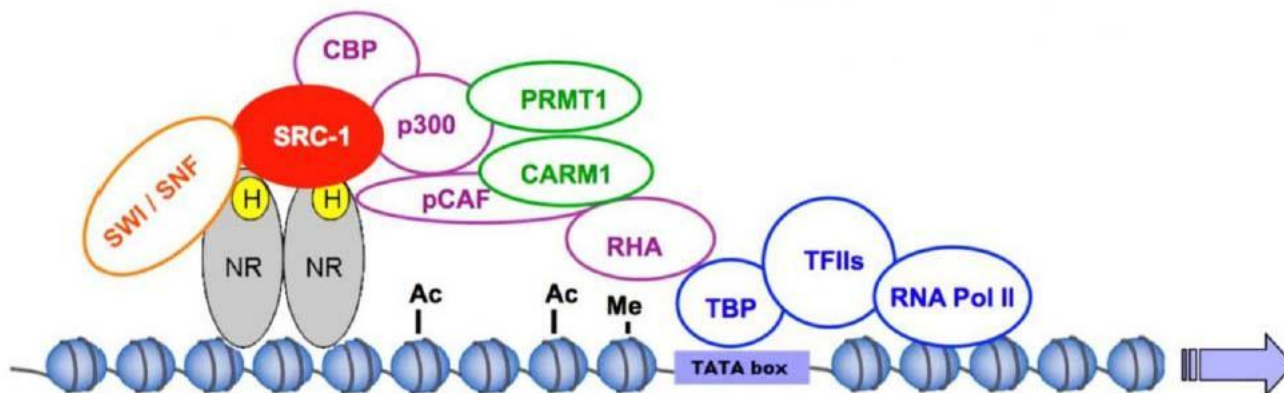


Figura 10. Mecanismo de acción de los coactivadores. SRC-1 coactiva la transcripción mediada por receptores nucleares (NRs) activados por su ligando, incluyendo al RP, y recluta a otros coactivadores formando en conjunto un gran complejo coactivador. Específicamente, SRC-1 se une a NRs a través de los motivos LXXLL e interactúa con CBP y p300 mediante su dominio de activación 1 (AD1), con CARM1 y PRMT1 a través de su AD2 y con SWI/SNF mediante su AD3. p/CAF es un factor asociado a p300/CBP. SRC-1, CBP, p300 y p/CAF tienen actividad de histona acetiltransferasa. CARM1 y PRMT1 son histonas metiltransferasas. RHA es una RNA helicasa A. SWI/SNF es un complejo de remodelación de la cromatina dependiente de ATP. La formación del complejo coactivador resulta en remodelación de la cromatina y favorece la interacción de los NRs con la maquinaria de transcripción basal. Ac: acetilación; Me: metilación; TBP: proteína de unión a caja TATA.

SRC-1 contribuye a la regulación de la transcripción de genes mediada por receptores nucleares y se ha demostrado que el RP recluta preferentemente a SRC-1 después de la administración de P en la línea celular de cáncer de mama T47D (Li *et al.*, 2003), en la línea celular HeLa (Tung *et al.*, 2006) y en el útero del ratón (Han *et al.*, 2006), mostrando a su vez un aumento en la actividad transcripcional del RP.

En ratones “knockout” para SRC-1 se ha observado una resistencia parcial a hormonas esteroides y una disminución en el crecimiento del útero y glándula mamaria (Xu *et al.*, 1998). La eliminación de SRC-1 modifica el patrón de

expresión de genes involucrados en el ciclo celular y el metabolismo energético (Xu *et al.*, 2009).

Se ha sugerido que cambios en el nivel de expresión de coactivadores pueden influir en la expresión de genes blanco de P y así participar en el desarrollo de diversas enfermedades de una manera importante (Walsh *et al.* 2012).

La expresión de la proteína de SRC-1 es baja en células epiteliales de la glándula mamaria, sin embargo, del 19% al 34% de los tumores de mama humanos presentan alta expresión de SRC-1, que se ha asociado con alta malignidad del tumor, positividad al HER2, recurrencia de la enfermedad y resistencia a terapia endocrina (Fleming *et al.*, 2004; Kurebayashi *et al.*, 2000).

Estudios *in vitro*, han demostrado que SRC-1 tiene un papel importante en la proliferación e invasión de células cancerosas a través de múltiples vías. En células de cáncer de mama MCF-7, la sobre-expresión de SRC-1 en células positivas al RE- α conlleva a un aumento en la expresión del factor derivado de células estromales 1 α (SDF-1 α), el cual induce la invasión y metástasis en células que expresan altos niveles del receptor de SDF-1 α (CXCR4) y otros genes prometastásicos (Kishimoto *et al.*, 2005).

El papel de SRC-1 en la iniciación, progresión y metástasis ha sido investigado en ratones *MMTV-PyMT* (tumor mamario inducido por el virus de polioma T) “knockout” para SRC-1, se ha determinado que SRC-1 promueve la transformación del epitelio mamario (transición epitelial-mesenquimal), migración, invasión y metástasis de células tumorales de mama al inducir la expresión de Twist y del factor estimulante de colonias 1 (Wang *et al.*, 2009; Qin *et al.*, 2009).

4.6. P y astrocitomas

A nivel de población, la frecuencia de astrocitomas es mayor en hombres que en mujeres (3:2) (Ohgaki *et al.*, 2007). Esta diferencia en la incidencia de astrocitomas relacionada al género se ha observado más acentuada a partir de los 14 años cuando la mujer ya presenta la menstruación y declina a los 50 años cuando se presenta la menopausia, sugiriendo que las hormonas sexuales pueden estar implicadas en el crecimiento de los astrocitomas (McKinley *et al.*, 2000).

Se ha sugerido que la P puede regular el crecimiento celular en tumores cerebrales (meningiomas, cordomas y astrocitomas) y que este efecto está mediado por su receptor nuclear (Camacho-Arroyo *et al.*, 2000; Carroll *et al.*, 1993; Carroll *et al.*, 1995). Otros estudios en nuestro laboratorio han demostrado que el tratamiento con P aumenta la proliferación de las líneas celulares de astrocitomas humanos U373 y D54 (grados III y IV respectivamente) y con el tratamiento de RU486 disminuye la proliferación de estas líneas celulares (González-Agüero *et al.*, 2007). Se ha reportado una correlación directa entre las características histológicas del grado del tumor astrocítico y el nivel de expresión de las isoformas del RP, aumentando su expresión en astrocitomas de grado IV (González-Agüero *et al.*, 2001; Khalid *et al.*, 1997). Los datos anteriores, en conjunto, sugieren que la P puede participar en el desarrollo de astrocitomas a través del RP lo que posiblemente involucra un mecanismo de acción genómico de la hormona.

Por otro lado, estudios en nuestro laboratorio han demostrado que SRC-1 se expresa en las líneas celulares de astrocitomas humanos U373 y D54, además de que, la P induce la expresión del mRNA y de la proteína de SRC-1 en la línea celular D54 (Hernández-Hernández *et al.*, 2010).

4.7. Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)

Los factores de crecimiento endotelial vascular (VEGFs) son una familia de 6 proteínas angiogénicas estructuralmente relacionadas (Tabla 2), que juegan un papel importante en el crecimiento y diferenciación de células endoteliales vasculares y linfáticas (Rosen, 2005).

Tabla 2. Miembros de la familia de VEGF y sus principales características (Rosen, 2005; The-UniProt-Consortium, 2010).

Miembro	Localización cromosómica	Tamaño de la proteína	Receptores a los que se une	Funciones generales
VEGF (VEGF-A)	6p12	Proteína precursora: 232 aa* / ~27 kDa	VEGFR-1, VEGFR-2 y neuropilina-1	Angiogénesis y mantenimiento vascular
VEGF-B	11q13	207 aa / ~21 kDa	VEGFR-1 y neuropilina-1	No establecido
VEGF-C [◇]	4q34.1-q34.3	419 aa / ~47 kDa	VEGFR-2 y VEGFR-3	Linfangiogénesis
VEGF-D [◇]	Xp22	354 aa / ~40 kDa	VEGFR-2 y VEGFR-3	Linfangiogénesis
VEGF-E (factor viral)	Genoma del virus Orf Poxvirus	Proteína precursora: 149 aa / ~20 kDa	VEGFR-2	Angiogénesis
Factor de crecimiento placentario (PGF)*	14q24-q31	221 aa / ~25 kDa	VEGFR-2 y neuropilina-1	Angiogénesis e inflamación.

*aa: aminoácidos.

*Expresión restringida a gónadas, corteza adrenal y placenta.

◇Contienen extensiones en las regiones N-terminal y C-terminal que no fueron encontradas más que en estos dos miembros de la familia de VEGF.

El VEGF, también conocido como VEGF-A o factor de permeabilidad vascular (VPF), el miembro más importante de la familia VEGF, es un mitógeno glicosilado que actúa específicamente sobre células endoteliales. VEGF estimula el crecimiento, sobrevivencia y proliferación de células endoteliales vasculares. Se ha demostrado que puede facilitar la sobrevivencia de vasos existentes, estimular el crecimiento de nuevos vasos, mediar el aumento en la permeabilidad vascular, estimular la vasodilatación (Ferrara, 2004), promover la migración celular e inhibir la apoptosis (Pruitt *et al.*, 2007). Fue aislado originalmente de células tumorales, entre las que se encuentran células de hepatocarcinoma de cobayo y la línea celular U-937 derivada de linfoma humano. También se ha encontrado que es producido por la línea celular GS-9L de glioma de rata y la línea NB41 de neuroblastoma de ratón. Si bien, VEGF se ha encontrado sobre-expresado en células tumorales (por ejemplo, provenientes de mama, próstata, pulmón y colon), es también producido por otros tipos celulares como células vasculares de músculo liso (Tischer *et al.*, 1991) y células de la hipófisis del ratón (Plouët *et al.*, 1989).

El gen de VEGF humano se encuentra localizado en el cromosoma 6p12, tiene 8 exones (Figura 10 A), 7 intrones y un único sitio principal para el inicio de la transcripción (-1038). En su región promotora no tiene caja TATA (Tischer *et al.*, 1991) y contiene tres ERP (de -1865 a -1860; de -716 a -711; y de +679 a +684), más de 6 sitios de proteína activadora 1 (AP-1), AP-2 y más de 10 sitios para el factor de transcripción Sp1 (proteína específica 1) (Mueller *et al.*, 2003). El tamaño del gen es de 16 kb, el dominio codificante del gen (intrones y exones) abarca aproximadamente 14 kb y produce una proteína que puede encontrarse como monómero (23 kDa, aunque puede tener de 18 a 24 kDa) (Tischer *et al.*, 1991) o como homodímero (aprox. 46 kDa) unido mediante un puente disulfuro (Pruitt *et al.*, 2007) (Figura 11).

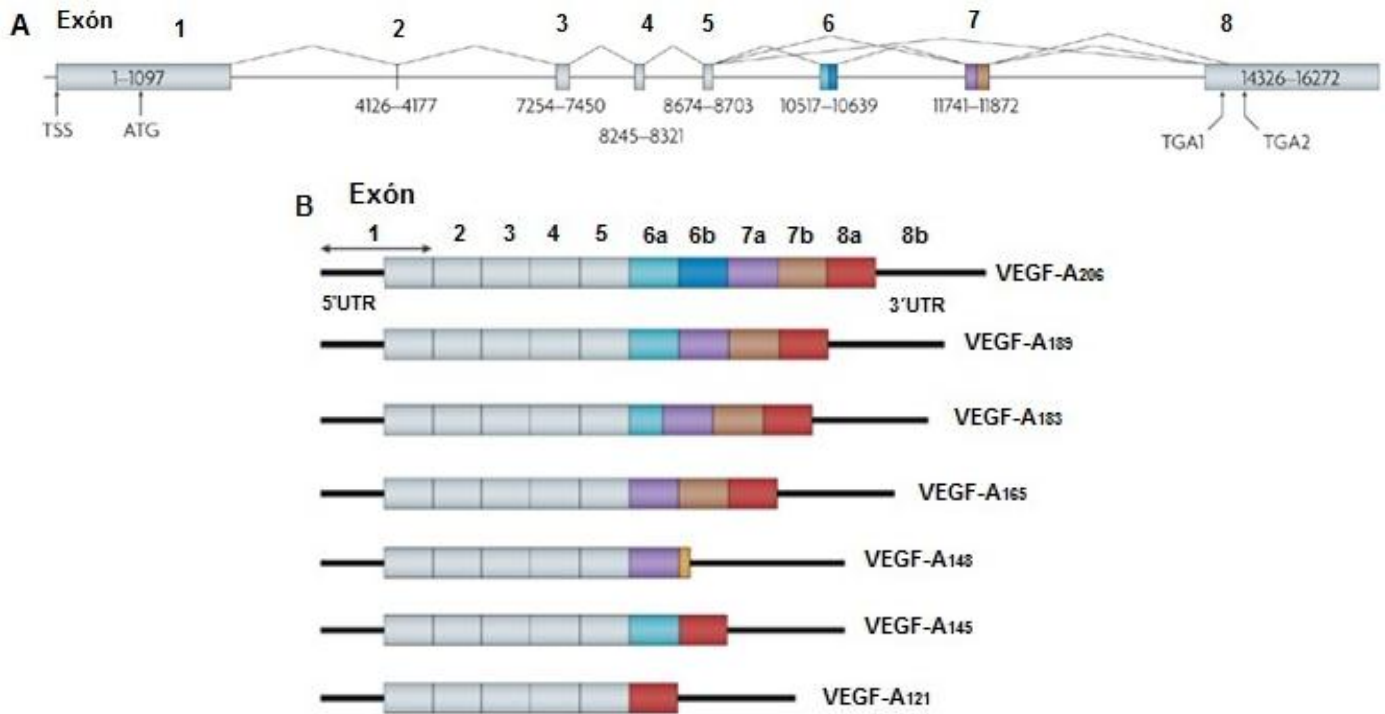


Figura 11. Estructura del gen de VEGF humano. A) El gen de VEGF se encuentra localizado en el cromosoma 6p12, tiene ocho exones (la posición es indicada con la numeración del 1 al 8) y siete intrones. B) Representación de las isoformas de VEGF originadas por splicing alternativo, se muestra los exones y el número de aminoácidos de cada isoforma (Tischer *et al.*, 1991).

El splicing alternativo de sus exones resulta en la producción de varias isoformas de la proteína, ya sea libremente secretadas o asociadas a células (Pruitt *et al.*, 2007). Todas las isoformas presentan un péptido señal en su región N-terminal, de 26 aminoácidos y codificado en su mayor parte por el exón 1 (Tischer *et al.*, 1991). La primera forma identificada de VEGF como proteína madura y como la más abundante es VEGF₁₆₅ (Ferrara, 2004), que contiene 165 aminoácidos (carece de los residuos codificados por el exón 6). Otras principales isoformas identificadas en humano son VEGF₁₂₁ (121 aminoácidos como resultado de la delección de residuos en la posición 116 por carencia de los exones 6 y 7), VEGF₁₈₉ (no hay remoción de exones por lo que tiene 189 aminoácidos) (Leung *et al.*, 1989; Tischer *et al.*, 1991) (Figura 10 B), VEGF₂₀₆ (206 aminoácidos) (Relf *et al.*, 1997) y VEGF₁₄₅ (no cuenta con 44 aminoácidos debido a la eliminación del

exón 7) (Poltorak *et al.*, 1997). Se ha encontrado que todas las isoformas se comportan de forma idéntica en solución, pero difieren en su habilidad para unirse a heparina en la matriz extracelular (Relf *et al.*, 1997).



Figura 12. Estructura de la proteína de VEGF. En la región N-terminal existe un péptido señal de 26 aminoácidos y un sitio de dimerización. En la parte central de la proteína se presenta un sitio de unión al receptor de VEGF 1 y 2 (VEGFR1 y 2). En la región C-terminal está el sitio de unión a heparina y seis aminoácidos que confieren propiedades angiogénicas (Ferrara, 2004).

VEGF es el mayor regulador *in vivo* de la angiogénesis (formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de los ya existentes) ocurrida en tumores (McKusick-Nathans *et al.*, 2010) y debido a la importancia de este factor y de su sistema de receptores en el crecimiento de tumores se ha sugerido que la intervención en este sistema puede proveer terapias prometedoras contra el cáncer (Folkman, 1995).

Se sabe que VEGF participa como un mediador central de angiogénesis en GBM. Se ha demostrado que la supresión de la función de VEGF inhibe el crecimiento celular en este tipo de tumores y se observa una regresión en la formación de vasos sanguíneos (Maity *et al.*, 2000). También se han encontrado concentraciones significativamente altas de VEGF en tejido proveniente de GBM en comparación con los niveles en otros tumores o en tejido cerebral sano (Takano *et al.*, 1996).

El grado de angiogénesis en un proceso tumoral puede ser un factor pronóstico significativo de la progresión, recurrencia y diseminación de un tumor, ya que estudios *in vivo* e *in vitro* han confirmado una correlación directa entre el grado de tumor y la expresión de VEGF en gliomas, incluyendo GBM (Maity *et al.*,

2000). Se han observado altos niveles de VEGF en fluido cerebrospinal de pacientes con astrocitomas de alto grado de evolución tumoral, mientras que esto no se ha visto en el fluido de pacientes con astrocitomas de bajo grado de evolución (Peles *et al.*, 2004).

4.8. Receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR)

El EGFR (también conocido como ErbB-1 o HER1) es un receptor de superficie membranal, miembro de la familia ErbB de receptores con actividad intrínseca de tirosina cinasa (RTK) (Bazley *et al.*, 2005). El receptor y sus ligandos participan en la señalización relacionada con proliferación, diferenciación, motilidad y sobrevivencia celular (Wang *et al.*, 2004). EGFR es específico para el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y otros miembros de la familia EGF, incluyendo TGF- α y el factor de crecimiento parecido a EGF de unión a heparina.

El gen de EGFR humano, también llamado ERBB1 (The-UniProt-Consortium, 2010) está localizado en el cromosoma 7p12, tiene 30 intrones, 28 exones y abarca alrededor de 200 kb de las cuales 123 kb están contenidas en el intrón 1 (Figura 13). Su región promotora tiene varias características especiales. Es de aproximadamente 1.1 kb, carece de caja TATA y de caja CAAT, contiene sitios múltiples de inicio de la transcripción (aunque *in vivo* el principal se encuentra localizado en -255) y es rico en G+C (88%). Se sabe que contiene cinco cajas GC y tiene cinco sitios de unión a Sp1 (Johnson *et al.*, 1988), esta unión es esencial para su activación. Análisis funcionales revelaron elementos para transcripción dentro del exón 1 y previo al sitio de inicio de la transcripción hacia la región 5' (Haley *et al.*, 1987).

El producto codificado por este gen es una glicoproteína de un único cruce transmembranal y que se expresa de forma ubicua (Pruitt *et al.*, 2007). Este receptor tiene como particularidad un dominio que le permite tener actividad de tirosina cinasa es decir, un grupo fosfato a residuos de tirosina en las proteínas (Figura 14) (The-UniProt-Consortium, 2010). Se ha sugerido que su actividad de

tirosina cinasa es requerida para la internalización o degradación de los complejos ligando-EGFR (Yang *et al.*, 1996).

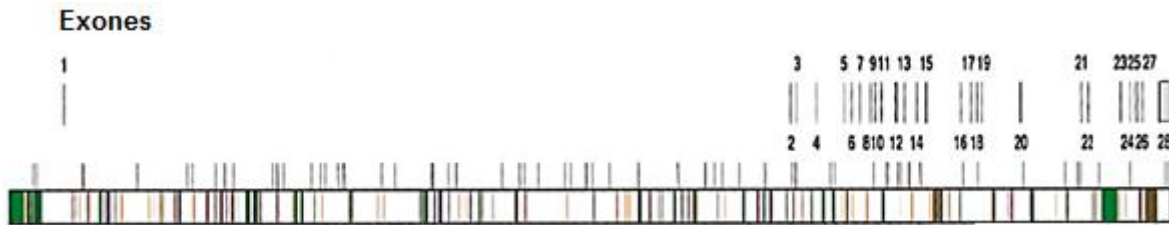


Figura 13. Mapa del gen de EGFR humano. Las líneas grises en la parte superior de la imagen indican la posición y número de exón (1-28). La porción gris claro del exón 28 indica la región 3' no traducida. Se muestra la posición de elementos repetidos a lo largo del gen: elementos nucleares interdispersos cortos (SINEs, línea naranja), elementos nucleares interdispersos largos (LINEs, línea verde), (Reiter *et al.*, 2001).

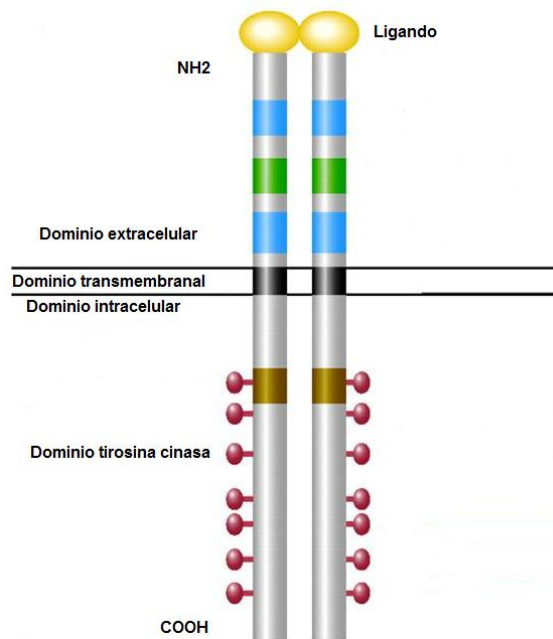


Figura 14. Esquema de la estructura de la proteína de EGFR. NH₂: extremo amino terminal, COOH: extremo carboxilo terminal.

Como resultado de splicing alternativo, EGFR tiene 4 isoformas. En todos los casos, los primeros 24 aminoácidos codifican para el péptido señal. La isoforma 1, la más importante y comúnmente referida sólo como EGFR, tiene todos los exones, su mRNA es de 5800 pb, (Reiter *et al.*, 2001; The-UniProt-Consortium, 2010) y una vez que se escinde el péptido señal tiene 1186 aminoácidos y pesa alrededor de 170 kDa (Kuan *et al.*, 2001). Su región extracelular cuenta con 621 aminoácidos (25-645), la región transmembranal es de 23 aminoácidos (646-668), mientras que la región intracelular tiene 542 aminoácidos (669-1210). La isoforma 2 presenta 10 exones, mRNA de aproximadamente 1800 pb, 405 aminoácidos incluyendo el péptido señal, pesa aproximadamente 45 kDa, puede actuar como antagonista de la acción de EGF y puede ser secretada al espacio extracelular. La isoforma 3 tiene 20 exones, mRNA de cerca de 3000 pb, pesa cerca de 77 kDa y tiene 705 aminoácidos. La isoforma 4 contiene 20 exones, mRNA de aproximadamente 2400 pb, pesa alrededor de 69 kDa y presenta 628 aminoácidos (Krieg *et al.*, 1992; Reiter *et al.*, 2001; The-UniProt-Consortium, 2010).

La unión del ligando al receptor induce homodimerización o heterodimerización (con otros miembros de la familia de receptores con actividad de cinasa, como Erb-2 en cáncer de ovario) del receptor (Kuan *et al.*, 2001), autofosforilación de residuos de tirosinas e internalización del complejo EGFR-ligando. Una vez que el receptor ha sido activado e internalizado, sirve como sitio de unión para reclutar moléculas transductoras de señales y fosforilar sustratos citoplásmicos, tales como Ras y proteína cinasa activada por mitógeno (MAPKs), con lo que se pueden activar vías que producen diversas respuestas celulares, incluyendo cambios en la expresión de genes, rearrreglos del citoesqueleto, efectos antiapoptóticos, estimulación de síntesis de DNA y un incremento en la proliferación y diferenciación celulares (Pruitt *et al.*, 2007) (Figura 12).

El nivel de expresión del gen de EGFR varía entre tipos celulares normales y transformados. Está amplificado en carcinoma de próstata, en células humanas A431 de carcinoma de epidermis, en varias líneas derivadas de carcinoma de células escamosas humanas (Johnson *et al.*, 1988) y en GBM (Furnari *et al.*,

2007). Además se sabe que la activación desregulada de EGFR actúa de forma oncogénica, estimulando el crecimiento y diseminación de las células cancerosas (Viana-Pereira *et al.*, 2008).

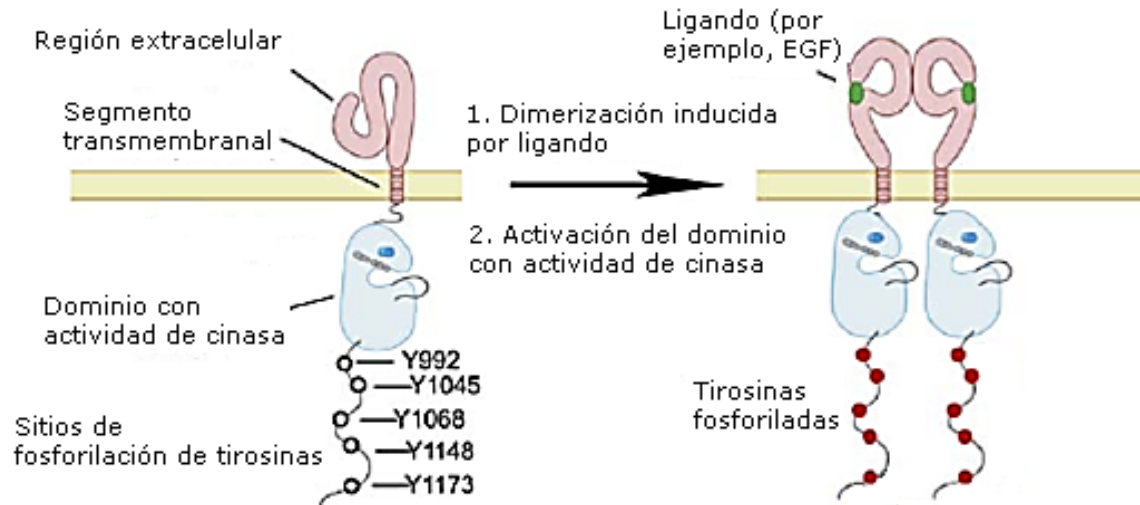


Figura 15. Representación general de la dimerización inducida por ligando y del proceso de activación de EGFR (Zhang *et al.*, 2006).

En estudios realizados en muestras de pacientes con GBM y en líneas celulares derivadas de GBM se encontró un incremento en el mRNA de EGFR, que no fue observado en astrocitomas de grado III ni de bajo grado de evolución tumoral (Godard *et al.*, 2003; Henn *et al.*, 1986; Sallinen *et al.*, 1999).

Formas aberrantes de EGFR no son comúnmente encontradas en astrocitomas de bajo grado de evolución, sin embargo, se encuentra frecuentemente mutado en GBM. En general, estas mutaciones producen un receptor truncado, con una baja prevalencia de mutaciones puntuales en la proteína. Además, diferentes mutaciones en EGFR pueden estar presentes en el mismo GBM y pueden resultar en la activación constitutiva del receptor. En general, la amplificación de EGFR se ha encontrado en aproximadamente 30-50% de los casos de GBM y 90% de estos muestran sobreexpresión de la proteína.

Debido a la alta frecuencia en que se presentan alteraciones en la proteína y el gen de EGFR y a su importancia en el desarrollo de GBM, han sido desarrolladas varias estrategias para disminuir su expresión y señalización, por ejemplo, tratamiento con inhibidores del receptor (Furnari *et al.*, 2007).

4.9. Ciclina D1

Las cinasas dependientes de ciclinas (CDK) heterodimerizan con subunidades reguladoras conocidas como ciclinas, las CDKs son proteínas que se expresan durante todo el ciclo celular, por otro lado, la expresión de las ciclinas es mayor en determinada fase del ciclo celular (Kim *et al.*, 2009). Las ciclinas tipo D (D1, D2 y D3) son proteínas específicas de la fase G1 del ciclo celular, a diferencia de otras ciclinas que son periódicamente sintetizadas durante el ciclo celular, la expresión de ciclinas tipo D es dependiente de señales mitogénicas. Debido a esta característica las ciclinas tipo D funcionan como sensores mitogénicos e integradores de señales extracelulares (Kim *et al.*, 2009). La ciclina D1 promueve la progresión del ciclo celular a través de la fase G1 al formar una holoenzima con CDK4 y 6, las cuales fosforilan a la proteína del retinoblastoma (pRB), esto induce la liberación del factor de transcripción E2F unido a pRB, posteriormente E2F activa la transcripción de genes involucrados en la transición de la fase G1 a S y en la síntesis de DNA (Figura 16). Además, la ciclina D1 regula funciones celulares de manera independiente a las CDKs mediante la interacción con reguladores transcripcionales como coactivadores y receptores nucleares como el RE (Klein *et al.*, 2008).

El gen de ciclina D1 humano se encuentra localizado en el cromosoma 11q13 tiene 5 exones y 6 intrones, la proteína posee un peso de 35 kDa (Figura 17). La región promotora del gen de ciclina D1 contiene numeroso sitios unión a factores de transcripción como AP-1, Sp1, RE y NF- κ B (Klein *et al.*, 2008). La expresión de ciclina D1 es regulada por factores de crecimiento como EGF y hormonas como el estradiol y P (Fu *et al.*, 2004; Musgrove, 2006). Señales mitogénicas inducen la expresión de ciclina D1 mediante la activación de vías de señalización como la que involucra la señalización de Ras-Raf-MEK (cinasa de las MAPKs)- cinasa regulada por señales extracelulares (ERK) resultando en la activación de un factor de transcripción que se une a la región promotora del gen de ciclina D1 (Cheng *et al.*, 1998).

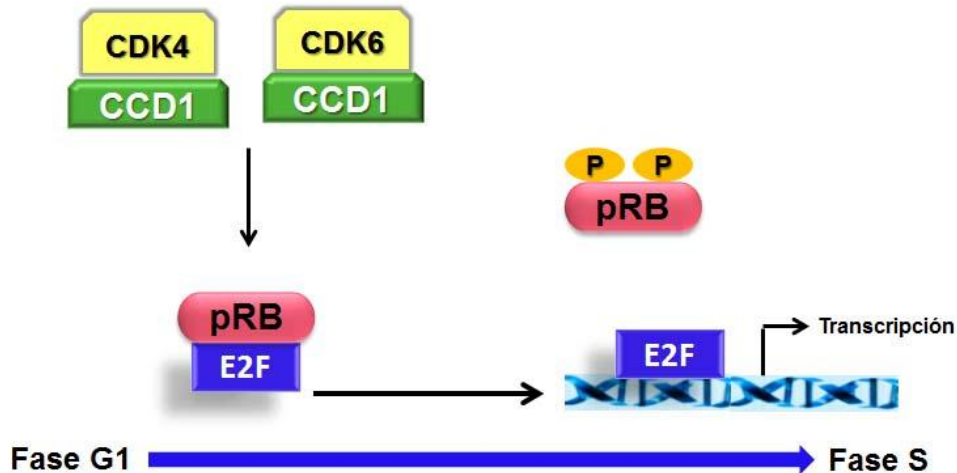


Figura 16. Mecanismo de acción de ciclina D1. La ciclina D1 promueve la progresión del ciclo celular de fase G1 a S al formar una holoenzima con las cinasas dependiente de ciclinas (CDK) 4 o 6, las cuales fosforilan a la proteína del retinoblastoma (pRB) induciendo la liberación del factor de transcripción E2F, posteriormente E2F activa la transcripción de genes involucrados en la transición de la fase G1 a S y en la síntesis de DNA.

La sobre-expresión de ciclina D1 se ha asociado con una corta supervivencia de pacientes con cáncer mama y con un aumento en la metástasis, lo cual es consistente con la capacidad de ciclina D1 para inducir la migración en células cancerosas (Musgrove, 2006). También, se ha encontrado una sobre-expresión de ciclina D1 en otros cánceres humanos como pulmón y astrocitoma (Fu *et al.*, 2004; Sallinen *et al.*, 1999). En estos últimos, se ha determinado una correlación positiva entre el aumento de la expresión de ciclina D1 y el grado de malignidad del tumor (Sallinen *et al.*, 1999). En líneas celulares de glioblastoma SHG-44 y U251 (astrocitoma grado IV) transfectadas con RNA de interferencia contra ciclina D1 la proliferación celular y la migración fueron inhibidas, mientras que la apoptosis se indujo. En contraste la sobre-expresión de ciclina D1 incrementó la proliferación y la capacidad invasiva de las células SHG-44 y U251 (Wang *et al.* 2012).

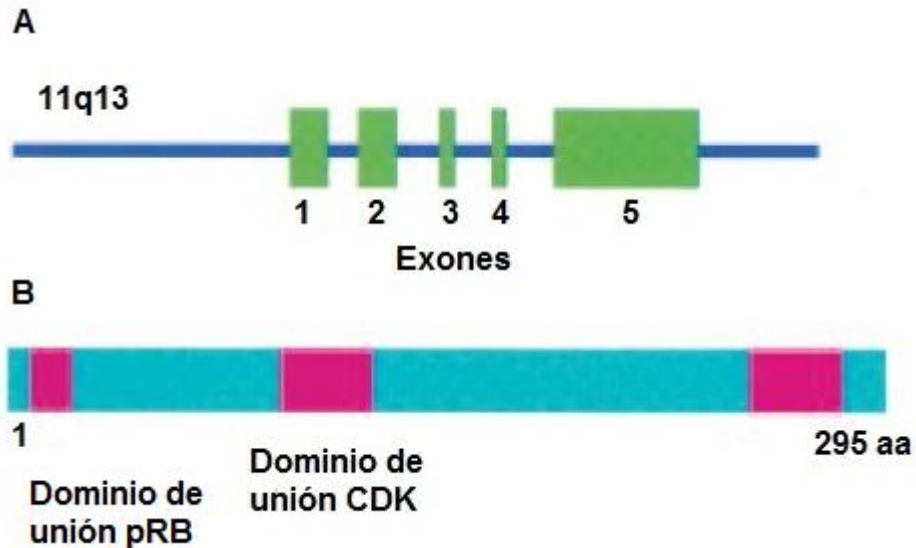


Figura 17. Estructura de ciclina D1. **A)** El gen de ciclina D1 humano está localizado en el cromosoma 11q13, el gen presenta 5 exones. **B)** La proteína de ciclina D1 tiene 295 aminoácidos, en el extremo N-terminal posee el dominio de unión a la proteína del retinoblastoma (pRB) y el dominio de interacción con las cinasas dependientes de ciclinas (CDK).

4.10. Efecto de la P sobre la expresión de VEGF, EGFR y Ciclina D1

Existen varios reportes que indican que la P regula la expresión del mRNA y de la proteína de VEGF en las líneas celulares de cáncer de mama BT-474, T47D, HCC-1428 y de adenocarcinoma endometrial Ishikawa y que este efecto es bloqueado por RU486 (Liang *et al.*, 2005; Mueller *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2004). Mueller y colaboradores (2003) han reportado en células de adenocarcinoma endometrial que la tasa de transcripción del gen de VEGF aumenta significativamente con el tratamiento de la progestina R5020, mientras que, con el tratamiento en conjunto con antagonistas como RU486 o ZK299 no se observó un incremento en la transcripción del gen.

Las progestinas R5020 y acetato de medroxyprogesterona (MPA) también inducen la expresión de VEGF en el útero del ratón y al igual que en cáncer de

mama, se ha determinado que su efecto es bloqueado por RU486 (Hyder *et al.*, 2000; Liang *et al.*, 2005).

Además, se ha reportado que en presencia de P aumenta la expresión de VEGF a nivel de la proteína y de una de las isoformas de su mRNA en el endometrio de primates (Greb *et al.*, 1997).

Por otro lado, se sabe que las progestinas regulan positivamente algunos de los factores de crecimiento que inician vías de señalización implicadas en el cáncer de mama, incluidos los miembros de la familia EGFR y sus ligandos; las células de cáncer de mama tratadas con progestinas son mucho más sensibles a la proliferación inducida por EGF. Así, la P puede actuar principalmente al sensibilizar las células de cáncer de mama a este factor de crecimiento y señales de citocinas (Lange *et al.*, 2009).

Se ha encontrado que el tratamiento con progestinas sintéticas aumenta la expresión de EGFR a nivel de mRNA, en la línea celular Ishikawa (Zhao *et al.*, 2007) y de manera tiempo y dosis dependiente en la línea celular T47D (Murphy *et al.*, 1988). Asimismo, se ha encontrado que las progestinas potencian los efectos de EGF mediante la regulación a la alta de EGFR en la superficie celular de células de cáncer de mama (Lange *et al.*, 1998).

El contenido de EGFR también se ha visto aumentado de forma dosis dependiente por el tratamiento con P en células de adenocarcinoma endometrial (Reynolds *et al.*, 1990).

Musgrove y colaboradores (Musgrove *et al.*, 1993) reportan que en la línea celular T47D, la P promueve la proliferación celular debido a que regula la expresión de genes que controlan la progresión del ciclo celular como es la de ciclina D1. Se ha demostrado en la línea celular T47D que la expresión del mRNA de ciclina D1 aumenta paulatinamente con el tratamiento de P. Este efecto se puede apreciar a partir de las 2 h de tratamiento con un efecto máximo a las 6 h, posteriormente la expresión de ciclina D1 retorna a niveles basales, lo que ha coincidido con la entrada de las células a la fase S del ciclo celular. La inducción del mRNA de ciclina D1 por P es un evento mediado por el RP, ya que con el tratamiento de RU486 se elimina esta inducción. En células T47D tratadas con MPA se ha

demostrado que la interacción del RE α con el RP en el promotor del gen de ciclina D1 es esencial para inducir su expresión y la proliferación celular (Giulianelli *et al.* 2012).

5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se ha reportado en las líneas celulares de astrocitomas humanos U373 y D54 que la P induce la proliferación celular mediante el RP (González-Agüero *et al.*, 2007), además, se ha determinado que SRC-1 regula la actividad transcripcional del RP aumentándola (Tung *et al.*, 2006), por lo que se ha sugerido que SRC-1 puede tener un papel en la regulación de genes blanco de la P, mediante su interacción con el RP, sin embargo, se desconoce si la P regula la expresión de VEGF, EGFR y ciclina D1 mediante la participación del RP y de SRC-1 en astrocitomas humanos.

Por lo que en este trabajo se determinó la participación del RP y de SRC-1 en la regulación de la expresión de VEGF, EGFR y ciclina D1 en las líneas celulares de astrocitomas humano U373 y D54.

6. HIPÓTESIS

SRC-1 regulará la expresión de VEGF, EGFR y ciclina D1 inducida por P mediante el RP en las líneas celulares de astrocitomas humanos U373 y D54.

7. OBJETIVOS

7.1. Objetivo general

Determinar la participación de SRC-1 en la regulación de la expresión de VEGF, EGFR y ciclina D1 inducida por P mediante el RP en las líneas celulares de astrocitomas humanos U373 y D54.

7.2. Objetivos particulares

1) Analizar la expresión del mRNA y de la proteína de VEGF, EGFR y ciclina D1 y su regulación por P en las líneas celulares de astrocitomas humano U373 y D54.

2) Establecer la participación del RP en la regulación de la expresión de VEGF, EGFR y ciclina D1 en las líneas celulares U373 y D54 mediante el tratamiento con RU486

3) Determinar el efecto de la disminución de SRC-1 en la expresión del mRNA y de la proteína de VEGF, EGFR y ciclina D1 en las líneas celulares U373 y D54.

8. METODOLOGÍA

8.1. Cultivo celular

Las líneas celulares de astrocitomas humanos U373 (grado III) y D54 (grado IV) fueron cultivadas en medio DMEM con rojo fenol adicionado con suero fetal bovino (SFB) al 10% hasta obtener el 80% de confluencia celular. Una vez obtenida la confluencia se contó el número de células en un hemocitómetro (cámara de Neubauer) y se colocaron 1, 000,000 de células en cajas Petri de 10 cm con medio DMEM con rojo fenol adicionado con SFB al 10% durante 24 h, posteriormente se les cambió el medio por DMEM sin rojo fenol adicionado con SFB libre de hormonas (SFBs) al 10% durante 24 h. Las células recibieron posteriormente los tratamientos de vehículo (V, ciclodextrina 0.02% en agua estéril), P (10 nM), P (10 nM) en conjunto con RU486 (1 μ M) y RU486 (1 μ M) durante 6, 12, 24 y 48 h. Las dosis usadas modifican la proliferación de estas líneas celulares, así, como la expresión del RP (González-Agüero *et al.*, 2007). Las líneas celulares U373 y D54 fueron mantenidas a 37°C con 5% de CO₂ y 95% de humedad.

Al terminar los tiempos de tratamiento, se realizaron dos lavados a las células con PBS frío (4°C) y se les agregaron los reactivos necesarios para la extracción de RNA total o proteínas.

8.2. Sincronización de las líneas celulares

Para determinar la expresión de ciclina D1 se colocaron 500,000 células en cajas Petri de 10 cm cultivadas en medio DMEM con rojo fenol adicionado con SFB al 10% durante 24 h. Posteriormente, las células fueron cultivadas con medio DMEM sin rojo fenol y sin SFB durante 48 h para inducir el arresto de las células en la fase G1 del ciclo celular, transcurrido este tiempo, se realizó un cambio de medio por DMEM sin rojo fenol adicionado con SFBs al 10% y las células recibieron tratamiento con V, P, RU486 y P en conjunto con RU486 durante 6, 12,

24 y 48 h para determinar la expresión de ciclina D1 a nivel del mRNA. Para los experimentos del contenido de la proteína las células recibieron tratamiento durante 8 h, por que se ha determinado que la P induce la expresión del mRNA de ciclina D1 después de 3 a 6 h de tratamiento, y este efecto es inmediatamente reflejado a nivel de la proteína la cual retorna a niveles basales después de 12 h (Musgrove et al., 1993).

8.3. Extracción de RNA total

Para determinar el perfil de expresión de VEGF, EGFR y ciclina D1 a nivel de mRNA, a las células recolectadas se les agregó 1 ml de trizol (Invitrogen) a 4°C, se homogenizaron en el vortex, se les agregaron 200 µl de cloroformo, se agitaron y se mantuvieron en hielo durante 5 min. Al final se obtuvieron dos fases: la inferior de color rojo compuesta por fenol:cloroformo y la porción superior incolora, el RNA quedó en esta última fase, mientras que el DNA y las proteínas se mantuvieron en una interfase y en la fase orgánica, respectivamente.

Para la precipitación del RNA, se transfirió la fase incolora a un tubo eppendorf, se agregó un volumen equivalente al extraído de isopropanol y se mantuvieron las muestras a 4°C toda la noche. Posteriormente se centrifugaron las muestras a 12000 rpm durante 15 min a 4°C. El RNA se observó en una pastilla de color blanca amarillenta. Después, se retiró el sobrenadante de las muestras, se realizó un lavado con etanol al 75% (1 ml). Se centrifugaron las muestras a 7500 rpm durante 8 min a 4°C, se realizó otro lavado con etanol al 80% y se centrifugaron las muestras a 7500 rpm durante 8 min a 4°C, se eliminó el sobrenadante y se secó la pastilla formada de cada muestra. La cantidad de RNA extraído se cuantificó en el espectrofotómetro a 260 y 280 nm. Para conocer las condiciones del RNA extraído, éste se analizó en geles de agarosa al 1% en condiciones desnaturizantes (con formaldehído 37%). Se utilizaron las muestras en las que el RNA estuviera íntegro, determinado por la observación clara de las bandas correspondientes a los RNAs ribosomales 28S, 18S y 5S, además, de que no se encontrara el RNA degradado ni la presencia de DNA.

8.4. RT-PCR

8.4.1. Oligonucleótidos

Para amplificar fragmentos de los genes de VEGF, EGFR, ciclina D1 y del RNA ribosomal 18S (control de carga) mediante la técnica de RT-PCR, se diseñaron oligonucleótidos a partir de las secuencias publicadas en GenBank para cada gen, las cuales fueron analizadas posteriormente por el programa Primer3 (NCBI).

Las secuencias que resultaron más adecuadas fueron sintetizadas y se muestran a continuación:

➤ VEGF

Sentido 5' - CTTCGCTTACTCTCACCTGCTT - 3'

Antisentido 5' - CAACCACTCACACACACAAC - 3'

Tamaño y región del producto amplificado: 243 pb; parte del exón 8

➤ EGFR

Sentido 5' - AGCTATGAGATGGAGGAAGACG - 3'

Antisentido 5' - GGATCCAGAGGAGGAGTATGTG - 3'

Tamaño y región del producto amplificado: 224 pb; parte del exón 8

➤ Ciclina D1

Sentido 5'- CTGTAGTGGGGTTCTAGGCATC – 3'

Antisentido 5'- CACGCTACGCTACTGTAACCAA –3'

Tamaño y región del producto amplificado: 158 pb; parte del exón 2

➤ 18S

Sentido 5' - AAACGGCTACCACATCCAAG - 3'

Antisentido 5' - CCTCCAATGGATCCTCGTTA - 3'

Tamaño del producto amplificado: 150 pb

8.4.2. Síntesis de DNA complementario (cDNA)

Se agregaron los siguientes componentes en un tubo eppendorf (volúmenes para una reacción): 1 μL de oligo (dT)₁₂₋₁₈ (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$; Invitrogen), 1 μL dATP, 1 μL dTTP, 1 μL dGTP, 1 μL dCTP, 2 μg de RNA total y agua destilada estéril (el volumen necesario para tener un total de 12 μL). La mezcla se incubó a 65°C durante 5 min y se mantuvo en hielo.

Posteriormente se añadieron 4 μL de buffer para primera hebra 5X (Invitrogen), 2 μL de DTT 0.1 M (Invitrogen), 1 μL de RNasa OUT (40 unidades/ μL ; Invitrogen), el contenido se mezcló suavemente y se incubó a 42°C durante 2 min. Transcurrido este tiempo se añadió 1 μL (200 unidades) de la enzima SuperScript™ II RT / MMLV-RT (Invitrogen) y la muestra se incubó a 42°C durante 50 min. Para inactivar la reacción, se calentó a 70°C durante 15 min.

En esta fase del RT-PCR se incluyó un control negativo al cual no se le agregaron los 2 μL de RNA total.

8.4.3. PCR

Con la finalidad de determinar el número de ciclos necesarios para realizar la amplificación de fragmentos de VEGF, EGFR y ciclina D1 se realizó una curva de 20, 25, 30, 35 y 40 ciclos. Para definir la temperatura de alineamiento de los oligonucleótidos, se realizó una curva de temperaturas que incluyó 48, 52, 56, 60 y 64°C.

Se realizó un calentamiento inicial de la reacción durante 10 min a 94°C para asegurar la completa desnaturalización del cDNA. Posteriormente se efectuaron 25 ciclos de amplificación para VEGF, EGFR, ciclina D1 y 18S en las siguientes condiciones: 1 min a 94°C, 1 min a 56°C, 1 min a 72°C. La etapa de extensión final se llevó a cabo a 72°C durante 5 min.

Se incluyeron dos controles negativos, uno sin muestra de RNA total (que proviene desde la fase de síntesis de cDNA) y otro al que no se le agregó cDNA.

Para una reacción de amplificación se utilizaron los siguientes componentes:

Buffer de PCR II 10X (Tris-HCl 200 mM pH 8.4 y KCl 500 mM).....	2.5 μ L
MgCl ₂ 25 mM.....	1.2 μ L
dATP (10 mM).....	1 μ L
dTTP (10 mM).....	1 μ L
dGTP (10 mM).....	1 μ L
dCTP (10 mM).....	1 μ L
Oligonucleótido sentido (15 μ M).....	0.85 μ L
Oligonucleótido antisentido (15 μ M).....	0.85 μ L
Taq DNA polimerasa (5 U/ μ L).....	0.5 μ L
DNA molde (cDNA previamente sintetizado).....	2 μ L
Agua destilada estéril.....	13.1 μ L
Volumen total	25 μ L

Para normalizar las posibles diferencias en la cantidad cargada de cDNA, se realizó también la determinación de la expresión del gen 18S por medio de la técnica de RT-PCR como se describió previamente.

Los productos de la amplificación se analizaron a partir de lo obtenido por electroforesis de las muestras en geles de agarosa al 2% y se observaron en un transiluminador de rayos UV. Se utilizó una cámara digital Kodak DC290 Zoom para obtener la imagen digital de las bandas observadas en cada gel.

8.5. Extracción de proteínas totales

Con la finalidad de determinar el contenido de la proteína de VEGF, EGFR y ciclina D1 se realizó la extracción de proteínas a partir de las células U373 y D54, para lo cual, se les agregaron 400 μ L de buffer RIPA con una mezcla de inhibidores de proteasas (Tris-HCl 50 mM pH 7.5, NaCl 150 mM, Nonidet P-40/Tritón 1%, desoxicolato de sodio 0.5%, SDS 0.1%, EDTA 1 mM, AEBSF (amino

etil bencenil sulfonil fluoruro) 2 mM, aprotinina 0.3 μ M, bestatina 130 μ M, E-64 14 μ M, leupeptina 1 μ M y PMSF 100 μ g/mL) a 4°C y se incubaron durante 1 hora en hielo. Para asegurar el lisado de las células, las muestras se hicieron pasar a través de una aguja de 21G x 32 mm. Posteriormente se centrifugaron a 14,000 rpm por 15 min a 4°C, se separó el sobrenadante y fue almacenado a 4°C en tubos eppendorf de 1.5 mL para su posterior cuantificación y separación de las proteínas mediante electroforesis.

La concentración de proteínas en el sobrenadante se determinó espectrofotométricamente a 280 nm en un Thermo Scientific NanoDrop.

8.6. Western blot

Cada muestra de proteína obtenida de las células (tomando un volumen correspondiente a 100 μ g) se mezcló con buffer de Laemmli 2X (Tris-base pH 6.8 100 mM, azul de bromofenol al 0.1%, glicerol al 20%, SDS al 4%, β -mercaptoetanol al 10%) en una proporción proteína-buffer de 2:1 (v/v) a 4°C, se hirvieron durante 5 min y se depositaron en geles de poliacrilamida. Las proteínas se separaron por electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 10% a 60 volts hasta que las muestras cruzaran el gel concentrador (a 4%) y después a 90 volts para el gel de corrida durante 2 horas.

Las proteínas fueron transferidas del gel a una membrana de nitrocelulosa (Millipore) a 70 mA, durante 2 h en una cámara semihúmeda. Posteriormente, las membranas se bloquearon con una solución de albúmina sérica de pollo (Sigma) al 1% y leche descremada en polvo al 5% en PBS durante 2 h a temperatura ambiente cuando la proteína a determinar fue EGFR, mientras que el tiempo de bloqueo para la detección de VEGF y ciclina D1 fue de 4 h.

Las membranas fueron incubadas durante toda la noche a 4°C con los siguientes anticuerpos: anti-VEGF (anticuerpo policlonal de conejo; Santa Cruz sc-152), anti-EGFR (anticuerpo policlonal de conejo; Santa Cruz sc-03), anti-ciclina D1 (anticuerpo monoclonal de ratón Santa Cruz sc-8396) en una dilución 1:250 (0.8 μ g/mL) o anti-SRC-1 (anticuerpo monoclonal de ratón, Upstate 05-522) en

una dilución 1:1000 (0.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Posteriormente fueron lavadas con PBS-Tween (Tween al 0.05%) 3 veces por 5 minutos y después incubadas a temperatura ambiente durante 45 min con un anticuerpo secundario anti-conejo o anti-ratón conjugado a peroxidasa (IgG-HRP, Santa Cruz sc-2357 y Santa Cruz sc-2033) en una dilución de 1:5000 (0.08 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Se utilizó un método de detección de alta sensibilidad (ECL, Amersham Pharmacia Biotech) para determinar la presencia de las proteínas estudiadas. Con este sistema, el peróxido de luminol junto con un activador son sustrato de la peroxidasa acoplada al anticuerpo secundario, los cuales, al reaccionar generan una señal de quimioluminiscencia la cual es detectada al exponer las membranas a placas autoradiográficas (Kodak BioMax light film).

Con la finalidad de corregir las posibles diferencias en la cantidad de proteína total cargada en cada pozo de los geles se realizó la determinación de α -tubulina, para lo cual, las membranas se bloquearon 2 h a temperatura ambiente con una solución de leche descremada en polvo al 10% en PBS, se incubaron con un anticuerpo primario anti- α -tubulina (Sigma T9026, Saint Louis, MO) en una dilución de 1:10,000 (0.04 $\mu\text{g}/\text{mL}$) durante toda la noche a 4°C, a continuación fueron lavadas con PBS-Tween 3 veces por 5 minutos y se incubaron 1 h con un anticuerpo secundario anti-ratón (IgG-HRP, Santa Cruz sc-2033) acoplado a peroxidasa en una dilución de 1:10,000 (0.04 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Posteriormente se utilizó el método de detección de alta sensibilidad descrito anteriormente.

8.7. Transfección en la línea celular D54

Se utilizó un RNA tallo asa corta (short hairpin RNA: shRNA) contra SRC-1 (Santa Cruz) para disminuir la expresión de este coactivador (shSRC-1) y un shRNA no complementario a la secuencia de SRC-1 (Santa Cruz) como control (shControl). La eficiencia de transfección se determinó utilizando un plásmido que contiene la secuencia que codifica para la proteína verde fluorescente (pmax-GFP). 500,000 células D54 fueron sembradas y cultivadas en medio DMEM con rojo fenol adicionado con SFB al 10%. Las células D54 fueron transfectadas con

pmax-GFP, shSRC-1 y con shControl utilizando el reactivo de transfección FUGENE® HD (Roche, Basel, Switzerland). Se realizaron las siguientes preparaciones: 1 µl de pmax-GFP diluido en 99 µl de medio DMEM sin SFB, 2 µl de shSRC-1 o shcontrol fueron diluidos en 98 µl de medio DMEM sin SFB, por otro lado, 18 µl de FUGENE® HD fueron diluidos en 82 µl de medio DMEM sin SFB y se incubaron durante 5 min a temperatura ambiente, transcurrido este tiempo, se mezclaron las preparaciones para la formación del complejo pmax-GFP, shSRC-1 o shcontrol-FUGENE® HD y se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente. El complejo fue añadido a cada una de las cajas que contenían las células D54 cultivadas con medio DMEM con rojo fenol adicionado con SFB al 10% y sin antibiótico durante 24 h. Posteriormente, se realizó un cambio de medio por DMEM sin rojo fenol adicionado con SFBs al 10% y sin antibiótico. Las células D54 recibieron tratamiento con V, P, RU486 y P en conjunto con RU486 durante 24 h. Las células transfectadas con pmax-GFP fueron analizadas en un microscopio de fluorescencia (Nikon ECLIPSE E600). El contenido de la proteína de SRC-1, VEGF, EGFR y α -tubulina fue determinado mediante Western blot.

8.8. Análisis densitométrico y estadístico

Las imágenes y placas obtenida fueron sometidas a un análisis densitométrico para cuantificar la expresión de VEGF, EGFR, ciclina D1, SRC-1 y α -tubulina de acuerdo a la intensidad de cada banda, utilizando un escáner HP Scanjet G3110 y mediante el programa Chemilmager 4400. Para cada experimento los datos resultantes de VEGF y EGFR se normalizaron con los de 18S y α -tubulina.

Los datos fueron analizados mediante la prueba de ANOVA de una vía (comparación entre tratamientos) o de dos vías (comparación transfección y tratamientos), seguida por una prueba posthoc Tukey o Bonferroni respectivamente. Se utilizó el programa SPSS 13.0 (SPSS Inc. Chicago, IL) para calcular los valores de probabilidad, donde $P < 0.05$ fue considerada como estadísticamente significativa.

9. RESULTADOS

En el presente trabajo se estudió la expresión de VEGF, EGFR y ciclina D1 a nivel del mRNA y de la proteína en las líneas celulares U373 y D54 tratadas con P, RU486 o la combinación de ambos mediante RT-PCR y Western blot. En los experimentos de RT-PCR se observó una sola banda de 243, 224, 158 y 150 pb correspondiente al tamaño esperado del fragmento amplificado de VEGF, EGFR, ciclina D1 y 18S. En los experimentos de Western blot, VEGF, EGFR y ciclina D1 fueron detectados como bandas de 27, 150, 35 kDa, mientras que α -tubulina fue detectada como una banda de 55 kDa.

Se observó que en la línea celular U373 la expresión del mRNA de VEGF y EGFR no cambia con ninguno de los tratamientos administrados durante 6, 12, 24 y 48 h (Figura 18A y B). Asimismo, no se encontraron diferencias significativas en la expresión de VEGF y EGFR a nivel de la proteína en esta línea celular (datos no mostrados). En contraste, en la línea celular D54 se encontró que la expresión del mRNA de VEGF y EGFR aumentó significativamente con el tratamiento de P durante 12 h y este efecto fue bloqueado cuando se administró RU486 en conjunto con P (Figura 19A y B). Además, en la línea celular D54 se determinó que el contenido de la proteína de VEGF y EGFR no se modifica después de 12 h de tratamiento con P, sin embargo, a las 24 h se demostró que la proteína de VEGF y EGFR aumenta con el tratamiento de P, efecto que resultó bloqueado con la administración conjunta de P + RU486 (Figura 20A y B).

Las células fueron sincronizadas en la fase G1 del ciclo celular para determinar la regulación de la expresión de ciclina D1 por P. En la línea celular U373 se encontró que la expresión del mRNA de ciclina D1 incrementa significativamente con el tratamiento de P a las 6 h y este efecto fue bloqueado por el RU486 (Figura 21A). Además, se observó que el contenido de la proteína de ciclina D1 aumentó significativamente con el tratamiento hormonal a las 8 h (Figura 21B). Por otro lado, se determinó que en la línea celular D54 la expresión del mRNA de ciclina D1 no se modificó con ninguno de los tratamientos administrados durante 6, 12, 24 y 48 h (Figura 21C). Estos resultados en conjunto

sugieren que los efectos de P en la regulación de la expresión de VEGF, EGFR y ciclina D1 son mediados por el RP.

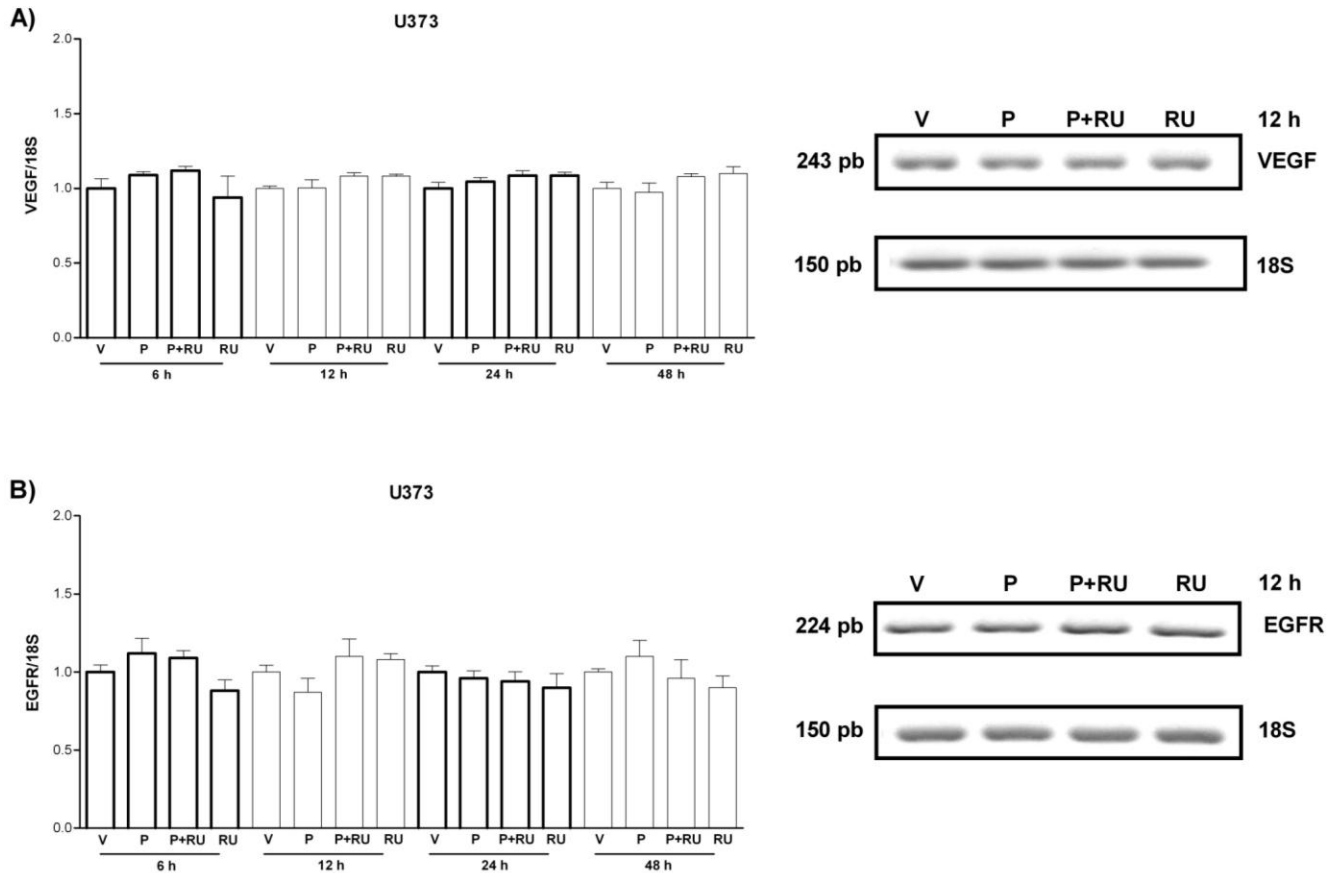


Figura 18. Expresión del mRNA de VEGF y EGFR en la línea celular U373. Las células fueron tratadas vehículo (V; ciclodextrina 0.02% en agua estéril), progesterona (P; 10 nM), P (10 nM) en conjunto con el antagonista del RP RU486 (P+RU; 1 μ M) y RU486 (RU; 1 μ M) durante 6, 12, 24 y 48 h. Los experimentos se llevaron a cabo utilizando oligonucleótidos específicos para VEGF (producto de amplificación de 243 pb), EGFR (producto de amplificación de 224 pb) o RNA ribosomal 18S (producto de amplificación de 150 pb) usado para normalizar los niveles de expresión de los dos genes. Análisis de RT-PCR realizado para el mRNA de VEGF **A)** y de EGFR **B)**. Se muestra el análisis densitométrico e imagen representativa de un experimento (12 h). Los resultados son expresados como media \pm S.E.M. de cuatro experimentos independientes.

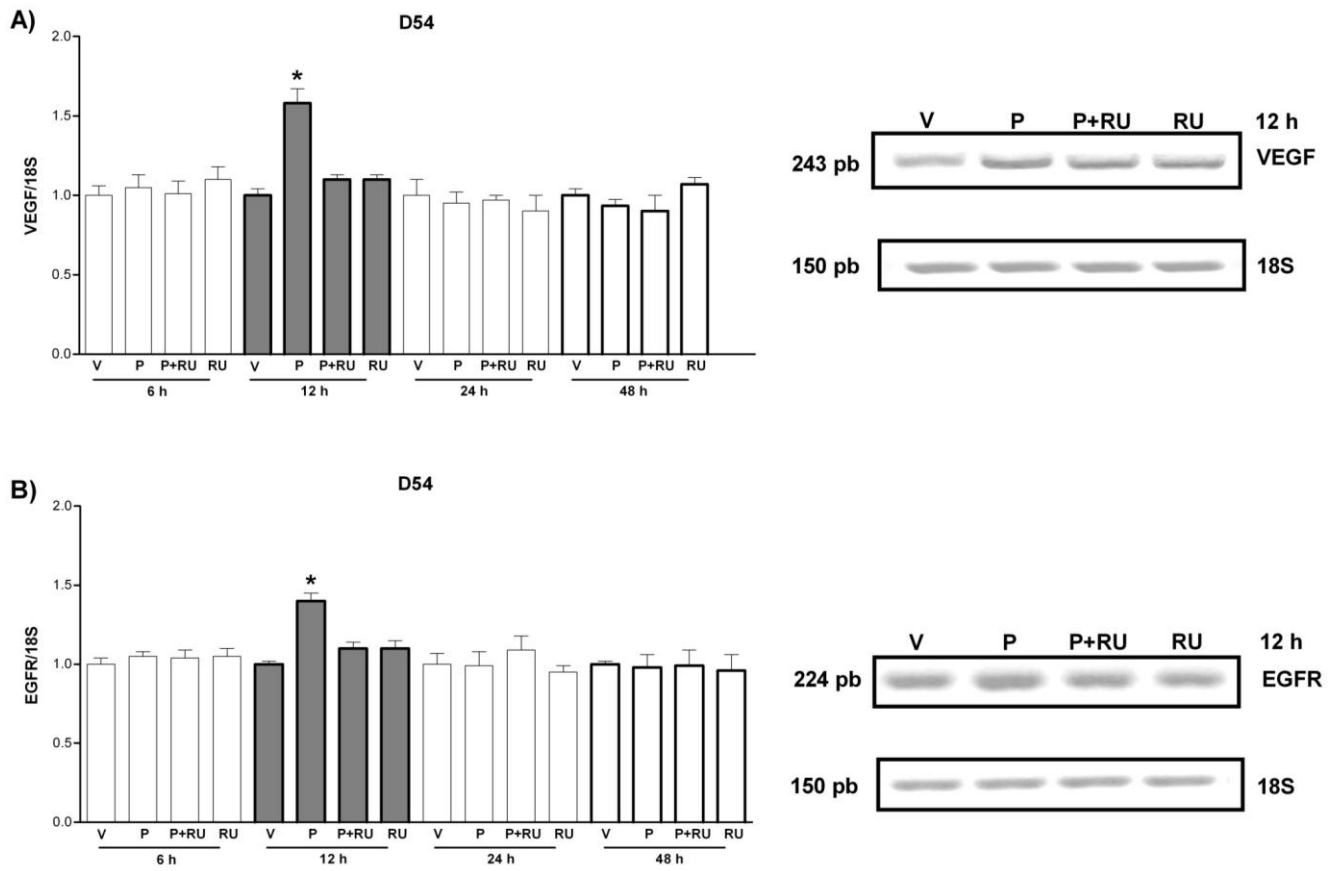


Figura 19. Efecto de la P sobre la expresión de VEGF y EGFR en la línea celular D54. Las células fueron tratadas vehículo (V; ciclodextrina 0.02% en agua estéril), progesterona (P; 10 nM), P (10 nM) seguido de RU486 (P+RU; 1 μ M) o RU486 (RU; 1 μ M) durante 6, 12, 24 y 48 h. Los experimentos se llevaron a cabo utilizando oligonucleótidos específicos para VEGF (243 pb), EGFR (224 pb) o RNA ribosomal 18S (150 pb) usado para normalizar los niveles de expresión de los dos genes. Análisis de RT-PCR realizado para el mRNA de VEGF **A)** y de EGFR **B)**. Se muestra el análisis densitométrico e imagen representativa de un experimento (12 h). Los resultados son expresados como media \pm S.E.M. de cuatro experimentos independientes. * $P < 0.05$ comparado con V, P+RU y RU. Las barras oscuras en la gráfica indican el efecto significativo de P.

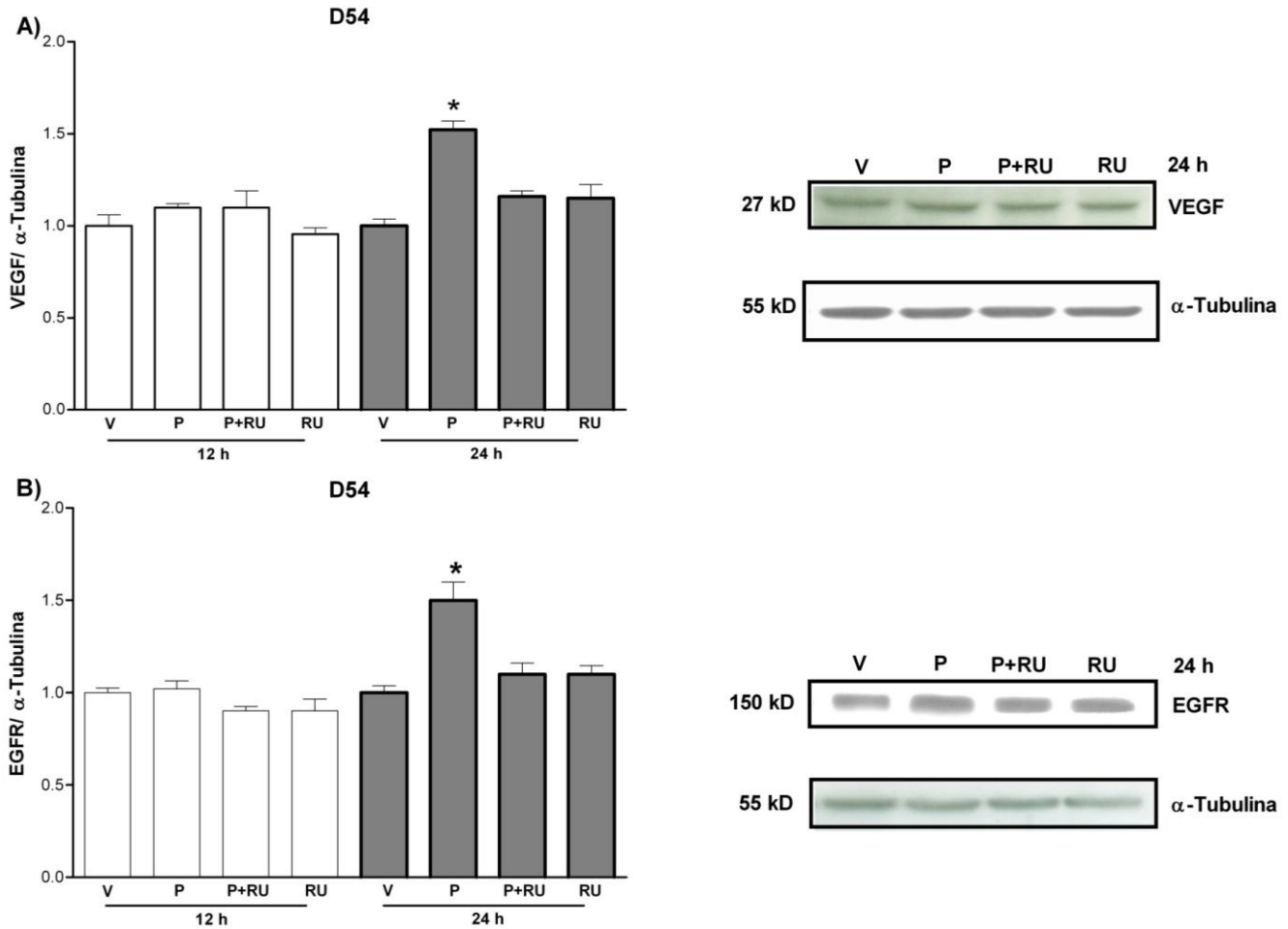


Figura 20. Regulación del contenido de la proteína de VEGF y EGFR por P mediada por el RP. Análisis del contenido de la proteína de VEGF **A)** y de EGFR **B)** mediante Western blot en células tratadas con vehículo (V; ciclodextrina 0.02% en agua estéril), progesterona (P; 10 nM), P (10 nM) seguido de RU486 (P+RU; 1 μ M) o RU486 (RU; 1 μ M) durante 12 y 24 h. Las células fueron lisadas y las proteínas obtenidas (100 μ g) fueron separadas por electroforesis en geles SDS-PAGE al 12% para VEGF o al 6% para EGFR, posteriormente fueron transferidas en membranas de nitrocelulosa e incubadas con anticuerpo para VEGF (27 kDa), EGFR (150 kDa) o α -tubulina (55kDa) usada para normalizar los niveles de expresión de las dos proteínas. Se muestra el análisis densitométrico e imagen representativa de un experimento (24 h). Los resultados son expresados como media \pm S.E.M. de cuatro experimentos independientes. * $P < 0.05$ comparado con V, P+RU y RU. Las barras oscuras en la gráfica indican el efecto significativo de P.

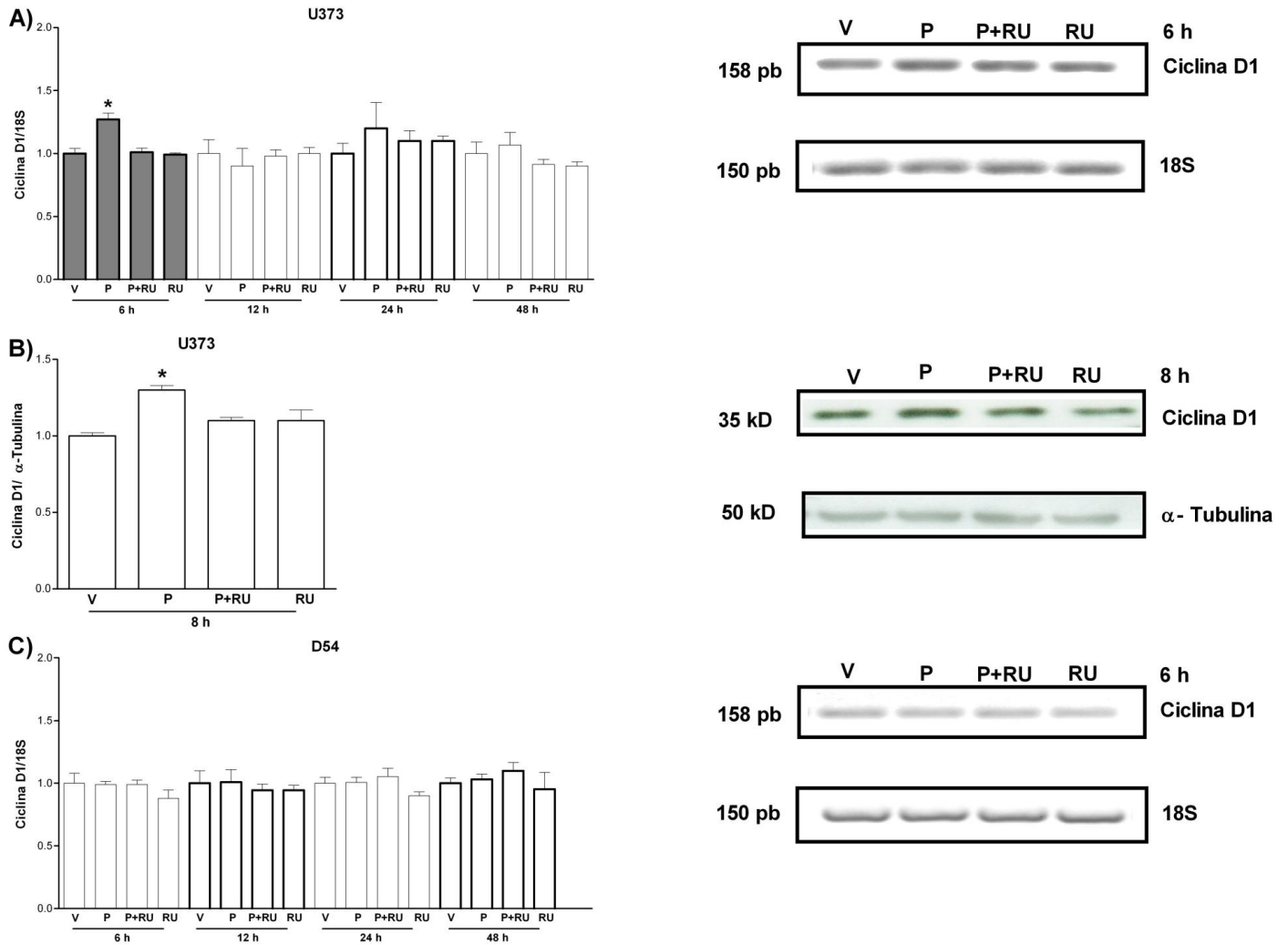


Figura 21. Regulación de la expresión de ciclina D1 por P a través del RP. Análisis del mRNA de ciclina D1 (producto de amplificación de 158 pb) mediante RT-PCR en células U373 **A)** y D54 **C)** tratadas con vehículo (V; ciclodextrina 0.02%), progesterona (P; 10 nM), P (10 nM) seguido de RU486 (P+RU; 1 μ M) o RU486 (RU; 1 μ M) durante 6, 12, 24 y 48 h. Análisis del contenido de la proteína de ciclina D1 **B)** mediante Western blot en células tratadas con V; P, P + RU o RU durante 8 h. Células U373 fueron lisadas y las proteínas obtenidas (100 μ g) fueron separadas por electroforesis en geles SDS-PAGE al 12%, transferidas en membranas de nitrocelulosa e incubadas con anticuerpo para ciclina D1 (35 kDa) o α -tubulina. Se muestra el análisis densitométrico e imagen representativa de un experimento (8 h). Los resultados son expresados como media \pm S.E.M. de cuatro experimentos independientes. * $P < 0.05$ comparado con V, P+RU y RU. Las barras oscuras en la gráfica indican el efecto significativo de P.

Los efectos de la P encontrados sobre la expresión de VEGF, EGFR y ciclina D1 en las dos líneas celulares de astrocitomas son resumidos en la siguiente tabla (Tabla 3).

Tabla 3. Efectos de P a nivel de mRNA y a nivel de la proteína de VEGF, EGFR y ciclina D1 en las líneas celulares U373 y D54.

	U373 (grado III)		D54 (grado IV)	
	mRNA	Proteína	mRNA	Proteína
VEGF	Sin efecto	Sin efecto	Aumento a las 12 h	Aumento a las 24 h
EGFR	Sin efecto	Sin efecto	Aumento a las 12 h	Aumento a las 24 h
Ciclina D1	Aumento a las 6 h	Aumento a las 8 h	Sin efecto	Sin efecto

Se estudió el efecto de SRC-1 sobre la expresión de VEGF y EGFR inducida por P en células D54 transfectadas con shRNA contra SRC-1. Se confirmó mediante Western blot que el contenido de la proteína de SRC-1 en las células D54 transfectadas con shSRC-1 fue significativamente menor (30%) que las células transfectadas con shControl (Figura 22A). En células D54 transfectadas con shControl, el tratamiento con P durante 24 h produjo el resultado esperado de un incremento en el contenido de la proteína de VEGF y EGFR, este efecto fue bloqueado con el tratamiento de RU486 (Figura 22B y C). La transfección con shSRC-1 redujo significativamente el contenido de la proteína de VEGF después de 24 h de tratamiento con P (Figura 22B). El análisis de los resultados mediante ANOVA de dos vías reveló que el tratamiento con P y la transfección con shSRC-1 produjeron un aumento y una disminución, respectivamente, sobre la expresión de VEGF (tratamiento: $F(1,32) = 63.52$, $P < 0.001$; transfección: $F(1,32) = 28.52$, $P < 0.001$) sin una interacción significativa entre el tratamiento y transfección. Por otro lado, la transfección con shSRC-1 no causó un efecto sobre el contenido de la proteína de EGFR (Figura 22C). Estos datos sugieren que SRC-1 participa en la regulación de la expresión de VEGF.

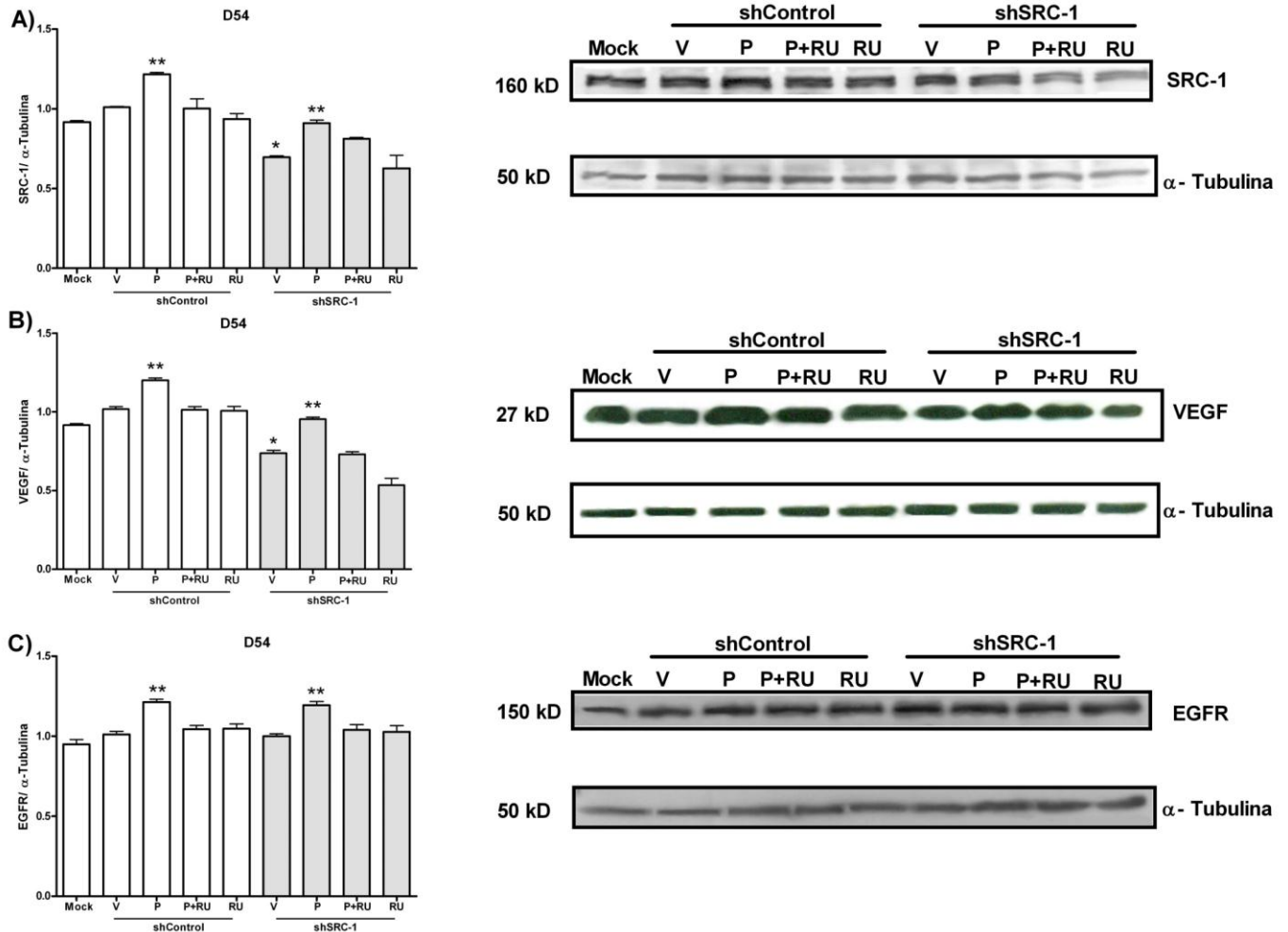


Figura 22. Efectos del silenciamiento de SRC-1 sobre la expresión de VEGF y EGFR estimulada por P. Células D54 fueron transfectadas con shControl o shSRC-1, 12 h después de la transfección el medio fue cambiado por medio DMEM sin rojo fenol suplementado con 10% de SFBs y tratadas con vehículo (V; ciclodextrina 0.02% en agua estéril), progesterona (P; 10 nM), P (10 nM) seguido de RU486 (P+RU; 1 μ M) o RU486 (RU; 1 μ M) durante 24 h. El contenido de la proteína de SRC-1 **A)**, VEGF **B)**, EGFR **C)** y α -tubulina fue determinado mediante Western blot. Se muestra el análisis densitométrico e imagen representativa de un experimento. Los resultados son expresados como media \pm S.E.M. de tres experimentos independientes. El análisis de ANOVA de dos vías indica un efecto significativo del tratamiento con P ($F(1,32) = 63.52$, $P < 0.001$) y la transfección con shSRC-1 ($F(1,32) = 28.52$, $P < 0.001$) sobre la expresión de VEGF sin una interacción significativa entre estos factores. * $P < 0.001$ comparado con todos los grupos transfectados con shControl, ** $P < 0.001$ comparado con V.

10. DISCUSIÓN

La P puede regular procesos biológicos como el crecimiento y la proliferación celular a través de la unión con su receptor intracelular, el RP (Henley *et al.*, 2005), el cual, mediante la activación de vías de señalización o mediante su función como factor de transcripción puede causar el aumento o disminución de la expresión de genes blanco (Boonyaratanakornkit *et al.*, 2008; Misiti *et al.*, 1998). Cuando el RP actúa como factor de transcripción, para mediar los efectos transcripcionales de la P, se une a secuencias específicas en el DNA e interactúa con la maquinaria de transcripción y corre reguladores como SRC-1 (Beato *et al.*, 1996).

La P, además de estar involucrada en procesos fisiológicos, participa en procesos patológicos como la tumorigénesis (Camacho-Arroyo *et al.*, 2000). Se ha reportado que la regulación de la expresión de factores de crecimiento y/o de sus receptores por P, es un mecanismo por el cual la hormona incrementa la tasa de proliferación de células normales y cancerosas. Por otro lado, existe evidencia de que el cáncer es resultado de cambios genéticos graduales que resultan en la inactivación de genes supresores de tumores y la activación de oncogenes entre éstos últimos se encuentran factores de crecimiento o sus receptores como VEGF, VEGFR, EGF o EGFR, que pueden encontrarse sobreexpresados en tumores celulares lo que deriva en la pérdida de importantes mecanismos de control celular. Debido a su influencia en el fenotipo de muchos tipos celulares malignos, el conocimiento de los factores de crecimiento, sus receptores y su regulación, es importante para su establecimiento como blancos terapéuticos (Hernández *et al.*, 1999; Nussey *et al.*, 2001).

Entre los tipos de tumores malignos de los cuales se ha propuesto que su desarrollo se encuentra influenciado por el ambiente hormonal, están los astrocitomas. Se ha sugerido que la P participa en el desarrollo de estos últimos y que los efectos de la hormona pueden estar mediados por el RP (Carroll *et al.*, 1993; González-Agüero *et al.*, 2001). También se ha demostrado que la P aumenta la proliferación celular en las líneas celulares U373 (grado III) y D54

(grado IV) derivadas de astrocitomas humanos, mientras que el tratamiento con un antagonista, RU486, bloquea el efecto de P (González-Agüero *et al.*, 2007).

En el presente trabajo se determinó la regulación de la expresión de VEGF, EGFR y ciclina D1 por P mediante el RP y SRC-1 en líneas celulares derivadas de astrocitomas humanos U373 y D54.

Los resultados obtenidos muestran que, en la línea D54, la P regula positivamente la expresión de VEGF. Se observó un aumento significativo de su mRNA a las 12 h de tratamiento, mientras que la administración de RU486 bloqueó este efecto, por lo que se puede sugerir que la regulación por P está mediada por el RP. Este efecto se vio reflejado a nivel de la proteína, ya que se observó un aumento significativo de su contenido a las 24 h de tratamiento con P y de la misma forma que para el mRNA, el RU486 bloqueó su efecto. VEGF es un regulador fundamental de la angiogénesis (Ferrara, 2009) y se ha reportado que células tumorales lo producen, incluyendo células de astrocitomas (Knizetova *et al.*, 2008; Zhou *et al.*, 2003). Existen varios reportes en los que, de manera similar a este trabajo, se observa que la P incrementa la expresión del mRNA y/o de la proteína de VEGF en el útero del ratón (Hyder *et al.*, 2000) y en las líneas celulares de cáncer de mama BT-474 HCC-1428 y T47D, efecto que es bloqueado por RU486 (Liang *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2004). También, en células de adenocarcinoma endometrial Ishikawa se ha reportado que la tasa de transcripción del gen de VEGF aumenta significativamente con el tratamiento de la progestina R5020, mientras que, con el tratamiento conjunto de P con antagonistas del RP como RU486 o ZK299 no se observa un incremento en la transcripción del gen (Mueller *et al.*, 2003).

Se sugiere que la P regula la expresión de VEGF mediante un mecanismo de acción genómico o clásico, donde el RP activado por P se une directamente al promotor del gen de VEGF, ya que se han identificado tres ERP. La localización de los ERP en la secuencia promotora de VEGF es la siguiente: ERP1 del -1865 al -1860; el ERP2 del -716 al 711 y el ERP3 del +679 al +684 (Figura 18).

Del mismo modo, en la línea celular D54, se determinó que la expresión de EGFR está regulada positivamente por P, ya que el tratamiento con esta hormona

incrementó significativamente su mRNA a las 12 h y este efecto se observó bloqueado por RU486. Al igual que en VEGF, el contenido de la proteína de EGFR aumentó de forma significativa a las 24 h de tratamiento con P, efecto que fue bloqueado por RU486, lo que sugiere que su regulación por P se lleva a cabo por medio del RP. Este aumento de la proteína refleja los cambios observados a nivel del mRNA de EGFR a las 12 h. Se ha establecido que EGFR está involucrado en la regulación de la proliferación y diferenciación celular (Mitsudomi *et al.*, 2012). Los resultados obtenidos en el presente estudio coinciden con otros reportes en los cuales se ha descrito que, en la línea celular T47D y en células estromales de endometrio, la P incrementa la expresión a nivel del mRNA y del contenido de EGFR, además de haberse demostrado que la inducción observada es bloqueada por RU486 (Faivre *et al.*, 2008; Musgrove *et al.*, 1991). Se ha reportado también, que progestinas sintéticas, como el acetato de medroxiprogesterona, aumentan la expresión de EGFR en células de adenocarcinoma endometrial (Zhao *et al.*, 2007).

Se sabe que el RP activado por su ligando puede unirse directamente al DNA regulando la transcripción de genes blanco de P que tienen ERP en su secuencia promotora, también, se ha reportado que el RP se une indirectamente al DNA mediante la asociación con otros factores de transcripción, incluyendo a la proteína específica 1 (Sp1) y a la proteína activadora (AP1) para regular la transcripción de genes blanco de P que carecen de ERP en su región promotora (Lockwood *et al.*, 2000). Faivre y colaboradores (2008) sugieren un mecanismo por el cual la P regula la expresión de EGFR, se conoce que el promotor de EGFR no contiene ERP, sin embargo, tiene sitios de unión a Sp1 donde el RP se puede asociar. La P unida al RP que se encuentra en citoplasma activa la vía de señalización de c-Src y MAPK, a su vez se induce la fosforilación de la isoforma B del RP nuclear (en la serina 345) promoviendo su activación y unión con el factor Sp1 en la región promotora del gen de EGFR, aumentando la transcripción de este gen (Figura 23).

Por otro lado, en la línea celular U373, se encontró que la P incrementa significativamente la expresión del mRNA de ciclina D1 (6 h) y este efecto fue

bloqueado por RU486, sugiriendo que el efecto de la hormona es mediado por el RP. Musgrove y colaboradores (1993) reportan que en la línea celular T47D, la P promueve la proliferación celular debido a que regula la expresión de genes que controlan la progresión del ciclo celular como es la de ciclina D1. Se conoce que la expresión de ciclina D1 aumenta en la fase temprana de G1 del ciclo celular, esto es importante para que las células progresen hacia la fase S y posteriormente se dividan. Se ha demostrado en la línea celular de cáncer de mama T47D que la expresión del mRNA de ciclina D1 aumenta paulatinamente con el tratamiento de P, este efecto se puede apreciar a partir de las 2 h de tratamiento con un efecto máximo a las 6 h, posteriormente la expresión de ciclina D1 retorna a niveles basales, esta regulación de la hormona coincide con la entrada de las células a la fase S del ciclo celular.

La inducción del mRNA de ciclina D1 por P es un evento mediado por el RP, ya que con el tratamiento de RU486 se bloquea esta inducción. Se sugiere que la P regula positivamente la expresión de ciclina D1 mediante el RP, este efecto puede deberse a la activación de vías de señalización y/o a través de su función como factor de transcripción, aunque el promotor del gen de ciclina D1 carece de ERP, el RP puede unirse indirectamente al DNA mediante la asociación con otros factores de transcripción (Figura 23). Se ha reportado, que la inducción de la expresión del gen de ciclina D1 es dependiente de la interacción del RP (activado por P) con c-Src en citoplasma, posteriormente se activa la vía de señalización de MAPKs. El promotor de ciclina D1 tiene múltiples elementos de unión para factores de transcripción incluyendo Sp1, AP1, RE y Ets, los cuales pueden ser blanco de la vía de MAPK activada por P (Boonyaratanakornkit *et al.*, 2008; Faivre *et al.*, 2008; Klein *et al.*, 2008). Por otro lado, en células T47D tratadas con MPA, se ha demostrado que la interacción del RE α con el RP en el promotor del gen de ciclina D1 es esencial para inducir su expresión y la proliferación celular (Giulianelli *et al.* 2012).

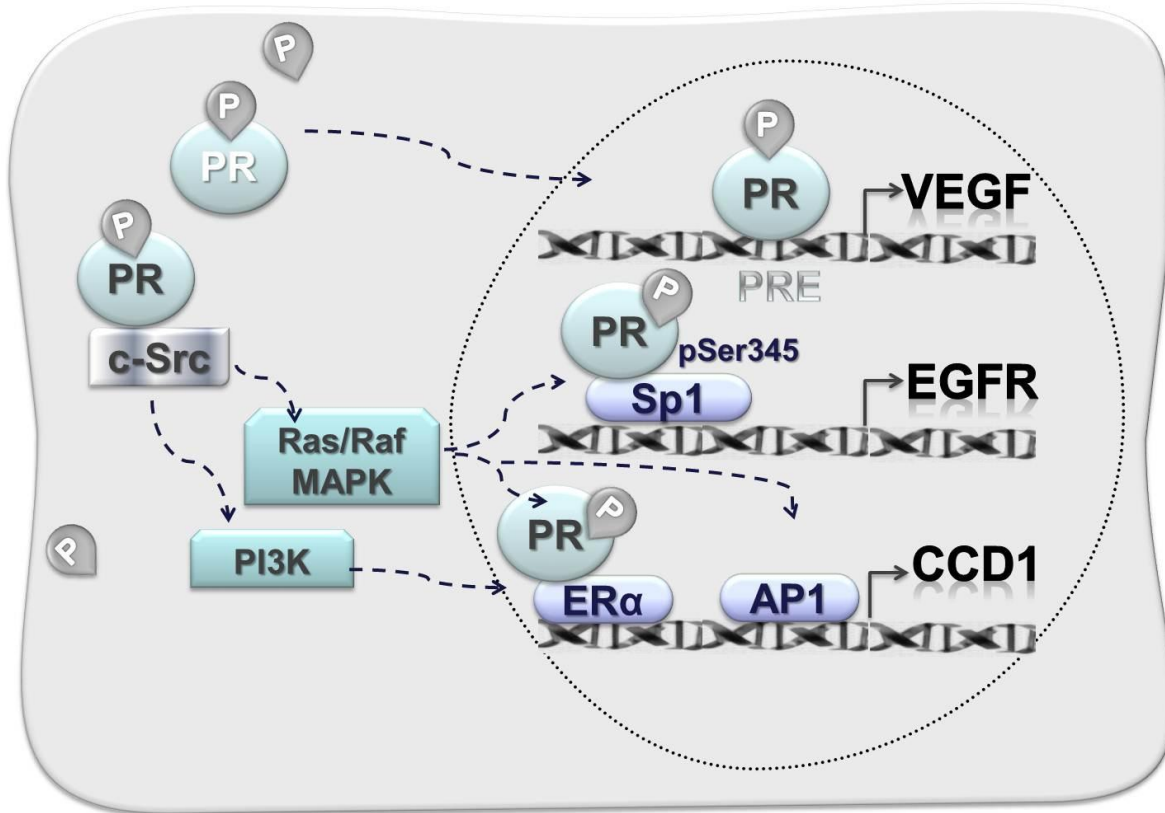


Figura 23. Mecanismos de acción propuestos para la regulación de P sobre la expresión VEGF, EGFR y ciclina D1 (CCD1) (Boonyaratanakornkit *et al.*, 2008; Faivre *et al.*, 2008; Giulianelli *et al.*; 2012, Liang *et al.*, 2005; Mueller *et al.*, 2003).

En conjunto estos datos sugieren que la P regula diferencialmente la expresión de VEGF, EGFR y ciclina D1 mediante el RP en líneas celulares de astrocitomas humanos. Diferencias en la regulación de estas proteínas entre las células U373 (grado III) y D54 (grado IV) podrían estar relacionados con el grado del tumor del cual se derivan. El grado histológico de un tumor se refiere a su grado de diferenciación o semejanza que tengan o no las células del tumor con las células normales del mismo tipo de tejido. Las células U373 exhiben características de malignidad como lo son la atipia nuclear y alta proliferación (Cabrera-Muñoz *et al.*, 2009; González-Agüero *et al.*, 2001; González-Arenas *et al.* 2012). A nivel molecular, los astrocitomas de grado III presentan alteraciones en la expresión de genes que regulan el ciclo celular como lo es la ciclina D1 (Louis *et al.*, 2007) y su expresión se ha relacionado a una activa y constante proliferación

celular (Sallinen *et al.*, 1999). En contraste, las células D54 exhiben características de una malignidad mayor como lo son la alta proliferación y propiedades invasivas (Cabrera-Muñoz *et al.*, 2009; González-Arenas *et al.* 2012). A mayor grado de evolución las células presentan mayor desdiferenciación y por consiguiente, una expresión diferencial de proteínas como factores de crecimiento y sus receptores que conllevan a una malignidad mayor (American-Joint-Committee-on-Cancer, 2010). Se ha reportado que la inducción de la expresión de VEGF y EGFR aumenta la malignidad de células de astrocitomas humanos, ya que promueven la proliferación, angiogénesis, invasión y metástasis (Furnari *et al.*, 2007).

Además, la regulación diferencial de la expresión de VEGF, EGFR y ciclina D1 por P observada en las líneas celulares U373 y D54 puede deberse a la expresión diferencial de proteínas que los regulan, como es el caso de la expresión de las isoformas RP-A y RP B y de coactivadores como SRC-1. En nuestro laboratorio, se ha determinado que en la línea celular U373 la isoforma RP-B es la predominante (RP-B:RP-A 3:1), mientras que en la línea celular D54 la isoforma predominante es la RP-A (RP-B:RP-A 0.66:1) (Cabrera-Muñoz *et al.*, 2009). Se ha reportado que RP-A y RP-B modulan la expresión de diferentes genes en el útero y células de cáncer de mama (Tung *et al.*, 2006). De igual forma, esta regulación diferencial podría verse influenciada por la expresión del coactivador SRC-1 ya que éste interviene en la remodelación de la estructura de la cromatina para favorecer la actividad transcripcional del RP (Tung *et al.*, 2006) y en la línea celular D54 se ha determinado que la P aumenta significativamente la expresión de SRC-1 (Hernández-Hernández *et al.*, 2010); esto es relevante porque el coactivador podría también aumentar la transcripción de genes blanco de P.

Los resultados obtenidos demuestran que el contenido de la proteína de SRC-1 en células D54 transfectadas con shSRC-1 fue significativamente menor que en las células transfectadas con shControl. De manera interesante, se observó que la P incrementó el contenido de la proteína de SRC-1 en células D54 transfectadas con shSRC-1 y shControl. Del mismo modo, previos estudios en nuestro laboratorio demuestran, que la P incrementa la expresión del mRNA de

SRC-1 en células D54 12 h después de su administración y este incremento se vio reflejado en el contenido de la proteína de SRC-1 12 h después (Hernández-Hernández *et al.*, 2010). Esto podría contrarrestar los efectos de la disminución de SRC-1 en células D54 transfectadas con shSRC-1.

En la línea celular D54, se determinó que la disminución de la expresión de SRC-1 no influyó en la expresión de EGFR inducida por P, sugiriendo que SRC-1 no es requerido para mediar la transcripción del mRNA de EGFR, es posible que otros coactivadores como SRC-2 y SRC-3 participen en su regulación. Con respecto a este último punto, sería interesante investigar los efectos de la disminución de SRC-2 y SRC-3 sobre la expresión de EGFR inducida por P.

Por otro lado, se demostró que en las células D54 transfectadas con shSRC-1 significativamente disminuyó el contenido de la proteína de VEGF. Varios estudios han demostrado la importancia fisiológica y patológica de la expresión de SRC-1 (Han *et al.*, 2005; Qin *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2009), asimismo, que SRC-1 es un modulador clave de la transcripción de genes mediada por RP (Han *et al.*, 2005; Tung *et al.*, 2006). Se ha reportado que la regulación de la expresión de SRC-1 es importante para la tumorigénesis, ya que existen estudios que demuestran que la expresión de SRC-1 aumenta significativamente en tumores de mama y se correlaciona positivamente con la recurrencia de la enfermedad y con una baja supervivencia libre de la enfermedad (Xu *et al.*, 2009). Del mismo modo, se ha demostrado *in vivo* que SRC-1 promueve la invasividad y metástasis en cáncer de mama al coactivar al factor de transcripción PEA3, el cual induce la expresión de Twist (un regulador clave de la metástasis) (Qin *et al.*, 2009). Los resultados obtenidos sugieren que SRC-1 actúa como un coactivador de la transcripción del mRNA de VEGF. El conocer cual es la función de SRC-1 en astrocitomas puede ser de utilidad para mejorar o proponer nuevas estrategias terapéuticas para inhibir el crecimiento de los astrocitomas humanos.

11. CONCLUSIONES

- La P regula positivamente la expresión del mRNA y de la proteína de VEGF y EGFR en la línea celular D54 derivada de astrocitomas humanos de grado IV, pero no en la línea celular U373, de grado III.
- La expresión del mRNA y de la proteína de ciclina D1 fue inducida por P en la línea celular U373.
- El efecto de la P sobre la regulación de la expresión de VEGF, EGFR y ciclina D1 está mediado por el RP.
- SRC-1 participa en la regulación de la expresión de VEGF en la línea celular D54.

12. REFERENCIAS

- American-Joint-Committee-on-Cancer (2010) What is Cancer Staging? Vol. 2010. Chicago.
- Badash, M (2009) Astrocitoma. New York: New York University Medical Center.
- Baulieu, EE (1999) Neuroactive neurosteroids: dehydroepiandrosterone (DHEA) and DHEA sulphate. *Acta Paediatr Suppl* 88(433): 78-80.
- Bazley, LA, Gullick, WJ (2005) The epidermal growth factor receptor family. *Endocr Relat Cancer* 12 Suppl 1: S17-27.
- Beato, M, Sanchez-Pacheco, A (1996) Interaction of steroid hormone receptors with the transcription initiation complex. *Endocr Rev* 17(6): 587-609.
- Boonyaratanakornkit, V, Bi, Y, Rudd, M, Edwards, DP (2008) The role and mechanism of progesterone receptor activation of extra-nuclear signaling pathways in regulating gene transcription and cell cycle progression. *Steroids* 73(9-10): 922-928.
- Bramley, T (2003) Non-genomic progesterone receptors in the mammalian ovary: some unresolved issues. *Reproduction* 125(1): 3-15.
- Bristol, RE (2009) Low-grade glial tumors: are they all the same? *Semin Pediatr Neurol* 16(1): 23-26.
- Buckner, JC, Brown, PD, O'Neill, BP, Meyer, FB, Wetmore, CJ, Uhm, JH (2007) Central nervous system tumors. *Mayo Clin Proc* 82(10): 1271-1286.
- Cabrera-Muñoz, E, González-Arenas, A, Saqui-Salces, M, Camacho, J, Larrea, F, Garcia-Becerra, R, Camacho-Arroyo, I (2009) Regulation of progesterone receptor isoforms content in human astrocytoma cell lines. *J Steroid Biochem Mol Biol* 113(1-2): 80-84.
- Cabrera-Muñoz, E, Hernández-Hernández OT, Camacho-Arroyo, I (2011) Role of progesterone receptor in human growth. *Curr Top Med Chem* 11(13): 1663-1667.
- Camacho-Arroyo, I, González-Agüero, G, Gamboa-Dominguez, A, Cerbon, MA, Ondarza, R (2000) Progesterone receptor isoforms expression pattern in human chordomas. *J Neurooncol* 49(1): 1-7.

- Camacho-Arroyo, I, González-Arenas, A, González-Agüero, G, Guerra-Araiza, C, González-Moran, G (2003) Changes in the content of progesterone receptor isoforms and estrogen receptor alpha in the chick brain during embryonic development. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 136(2): 447-452.
- Camacho-Arroyo, I, González-Arenas, A, González-Moran, G (2007) Ontogenic variations in the content and distribution of progesterone receptor isoforms in the reproductive tract and brain of chicks. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 146(4): 644-652.
- Camacho-Arroyo, I, Rodríguez-Dorantes, M (2006) Transcriptional activity regulated by progesterone receptor isoforms. In: *Molecular Endocrinology*, pp 25-38. Kerala India: Research Signpost.
- Carr, B, Bradshaw, K (2005) Enfermedades del ovario y del aparato reproductor femenino. In: HARRISON, Principios de Medicina Interna, Kasper, D, Braunwald, E, Fauci, A, Hauser, S, Longo, D, Jameson, J, Isselbacher, K (eds), 16 edn, pp 11566-11580. México: McGraw-Hill / Interamericana de México.
- Carroll, RS, Glowacka, D, Dashner, K, Black, PM (1993) Progesterone receptor expression in meningiomas. *Cancer Res* 53(6): 1312-1316.
- Carroll, RS, Zhang, J, Dashner, K, Sar, M, Black, PM (1995) Steroid hormone receptors in astrocytic neoplasms. *Neurosurgery* 37(3): 496-503; discussion 503-494.
- Clemm, DL, Macy, BL, Santiso-Mere, D, McDonnell, DP (1995) Definition of the critical cellular components which distinguish between hormone and antihormone activated progesterone receptor. *J Steroid Biochem Mol Biol* 53(1-6): 487-495.
- Cheng, M, Sexl, V, Sherr, CJ, Roussel, MF (1998) Assembly of cyclin D-dependent kinase and titration of p27Kip1 regulated by mitogen-activated protein kinase kinase (MEK1). *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(3): 1091-1096.
- Daumas-Duport, C, Scheithauer, B, O'Fallon, J, Kelly, P (1988) Grading of astrocytomas. A simple and reproducible method. *Cancer* 62(10): 2152-2165.
- Edward, A, Longo, D (2005) Principios del tratamiento del cáncer: cirugía, quimioterapia y tratamiento biológico. In: HARRISON, Principios de Medicina Interna, Kasper, D, Braunwald, E, Fauci, A, Hauser, S, Longo, D, Jameson, J,

- Isselbacher, K (eds), 16a. edición edn, pp 2804-2820. México: McGraw-Hill/Interamericana de México.
- Faivre, EJ, Daniel, AR, Hillard, CJ, Lange, CA (2008) Progesterone receptor rapid signaling mediates serine 345 phosphorylation and tethering to specificity protein 1 transcription factors. *Mol Endocrinol* 22(4): 823-837.
- Ferrara, N (2009) Vascular endothelial growth factor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29(6): 789-791.
- Ferrara, N (2004) Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev* 25(4): 581-611.
- Fleming, FJ, Hill, AD, McDermott, EW, O'Higgins, NJ, Young, LS (2004) Differential recruitment of coregulator proteins steroid receptor coactivator-1 and silencing mediator for retinoid and thyroid receptors to the estrogen receptor-estrogen response element by beta-estradiol and 4-hydroxytamoxifen in human breast cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 89(1): 375-383.
- Folkman, J (1995) Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* 1(1): 27-31.
- Fu, M, Wang, C, Li, Z, Sakamaki, T, Pestell, RG (2004) Minireview: Cyclin D1: normal and abnormal functions. *Endocrinology* 145(12): 5439-5447.
- Furnari, FB, Fenton, T, Bachoo, RM, Mukasa, A, Stommel, JM, Stegh, A, Hahn, WC, Ligon, KL, Louis, DN, Brennan, C, Chin, L, DePinho, RA, Cavenee, WK (2007) Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. *Genes Dev* 21(21): 2683-2710.
- Ganong, W (2006) Las gónadas: desarrollo y función del sistema reproductor. In: *Fisiología médica*, pp 387-425. México: El Manual Moderno.
- Giulianelli, S, Vaque, JP, Soldati, R, Wargon, V, Vanzulli, SI, Martins, R, Zeitlin, E, Molinolo, AA, Helguero, LA, Lamb, CA, Gutkind, JS, Lanari, C (2012) Estrogen receptor alpha mediates progesterone-induced mammary tumor growth by interacting with progesterone receptors at the cyclin D1/MYC promoters. *Cancer Res* 72(9): 2416-2427.
- Godard, S, Getz, G, Delorenzi, M, Farmer, P, Kobayashi, H, Desbaillets, I, Nozaki, M, Diserens, AC, Hamou, MF, Dietrich, PY, Regli, L, Janzer, RC, Bucher, P, Stupp, R,

- de Tribolet, N, Domany, E, Hegi, ME (2003) Classification of human astrocytic gliomas on the basis of gene expression: a correlated group of genes with angiogenic activity emerges as a strong predictor of subtypes. *Cancer Res* 63(20): 6613-6625.
- González-Agüero, G, Gutierrez, AA, González-Espinosa, D, Solano, JD, Morales, R, González-Arenas, A, Cabrera-Muñoz, E, Camacho-Arroyo, I (2007) Progesterone effects on cell growth of U373 and D54 human astrocytoma cell lines. *Endocrine* 32(2): 129-135.
- González-Agüero, G, Gutierrez, AA, González-Espinosa, D, Solano, JD, Morales, R, González-Arenas, A, Cabrera-Muñoz, E, Camacho-Arroyo, I (2007) Progesterone effects on cell growth of U373 and D54 human astrocytoma cell lines. *Endocrine* 32(2): 129-135.
- González-Agüero, G, Ondarza, R, Gamboa-Dominguez, A, Cerbon, MA, Camacho-Arroyo, I (2001) Progesterone receptor isoforms expression pattern in human astrocytomas. *Brain Res Bull* 56(1): 43-48.
- González-Arenas, A, Hansberg-Pastor, V, Hernández-Hernández, OT, González-García, TK, Henderson-Villalpando, J, Lemus-Hernández, D, Cruz-Barrios, A, Rivas-Suarez, M, Camacho-Arroyo, I (2012) Estradiol increases cell growth in human astrocytoma cell lines through ERalpha activation and its interaction with SRC-1 and SRC-3 coactivators. *Biochim Biophys Acta* 1823(2): 379-386.
- Graham, JD, Clarke, CL (1997) Physiological action of progesterone in target tissues. *Endocr Rev* 18(4): 502-519.
- Greb, RR, Heikinheimo, O, Williams, RF, Hodgen, GD, Goodman, AL (1997) Vascular endothelial growth factor in primate endometrium is regulated by oestrogen-receptor and progesterone-receptor ligands in vivo. *Hum Reprod* 12(6): 1280-1292.
- Guerra-Araiza, C, Camacho-Arroyo, I (2000) [Progesterone receptor isoforms: function and regulation]. *Rev Invest Clin* 52(6): 686-691.
- Hadjipanayis, CG, Van Meir, EG (2009) Brain cancer propagating cells: biology, genetics and targeted therapies. *Trends Mol Med* 15(11): 519-530.

- Haley, J, Whittle, N, Bennet, P, Kinchington, D, Ullrich, A, Waterfield, M (1987) The human EGF receptor gene: structure of the 110 kb locus and identification of sequences regulating its transcription. *Oncogene Res* 1(4): 375-396.
- Han, SJ, DeMayo, FJ, Xu, J, Tsai, SY, Tsai, MJ, O'Malley, BW (2006) Steroid receptor coactivator (SRC)-1 and SRC-3 differentially modulate tissue-specific activation functions of the progesterone receptor. *Mol Endocrinol* 20(1): 45-55.
- Han, SJ, Jeong, J, Demayo, FJ, Xu, J, Tsai, SY, Tsai, MJ, O'Malley, BW (2005) Dynamic cell type specificity of SRC-1 coactivator in modulating uterine progesterone receptor function in mice. *Mol Cell Biol* 25(18): 8150-8165.
- Henley, D, Lindzey, J, Korach, K (2005) Steroid Hormones. In: *Endocrinology. Basic and Clinical Principles*, Melmed, S, Conn, P (eds), 2 edn, pp 49-65. New Jersey: Humana Press.
- Henn, W, Blin, N, Zang, KD (1986) Polysomy of chromosome 7 is correlated with overexpression of the erbB oncogene in human glioblastoma cell lines. *Hum Genet* 74(1): 104-106.
- Hernández-Hernández, OT, Rodríguez-Dorantes, M, González-Arenas, A, Camacho-Arroyo, I (2010) Progesterone and estradiol effects on SRC-1 and SRC-3 expression in human astrocytoma cell lines. *Endocrine* 37(1): 194-200.
- Hernández, M, Ríos, H (1999) Oncogenes y cáncer. *Rev Cubana Oncol* 15(2): 131-139.
- Hyder, SM, Huang, JC, Nawaz, Z, Boettger-Tong, H, Makela, S, Chiappetta, C, Stancel, GM (2000) Regulation of vascular endothelial growth factor expression by estrogens and progestins. *Environ Health Perspect* 108 Suppl 5: 785-790.
- Ichimura, K, Ohgaki, H, Kleihues, P, Collins, VP (2004) Molecular pathogenesis of astrocytic tumours. *J Neurooncol* 70(2): 137-160.
- Johnson, AB, O'Malley, BW Steroid receptor coactivators 1, 2, and 3: critical regulators of nuclear receptor activity and steroid receptor modulator (SRM)-based cancer therapy. *Mol Cell Endocrinol* 348(2): 430-439.
- Johnson, AC, Ishii, S, Jinno, Y, Pastan, I, Merlino, GT (1988) Epidermal growth factor receptor gene promoter. Deletion analysis and identification of nuclear protein binding sites. *J Biol Chem* 263(12): 5693-5699.

- 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): 1603-1614.
- Khalid, H, Shibata, S, Kishikawa, M, Yasunaga, A, Iseki, M, Hiura, T (1997) Immunohistochemical analysis of progesterone receptor and Ki-67 labeling index in astrocytic tumors. *Cancer* 80(11): 2133-2140.
- Kim, JK, Diehl, JA (2009) Nuclear cyclin D1: an oncogenic driver in human cancer. *J Cell Physiol* 220(2): 292-296.
- Klein, EA, Assoian, RK (2008) Transcriptional regulation of the cyclin D1 gene at a glance. *J Cell Sci* 121(Pt 23): 3853-3857.
- Klein, TE, Chang, JT, Cho, MK, Easton, KL, Fergerson, R, Hewett, M, Lin, Z, Liu, Y, Liu, S, Oliver, DE, Rubin, DL, Shafa, F, M., SJ, B., AR (2001) Integrating Genotype and Phenotype Information: An Overview of the PharmGKB Project Vol. 1, pp 167-170: *The Pharmacogenomics Journal*.
- Knizetova, P, Ehrmann, J, Hlobilkova, A, Vancova, I, Kalita, O, Kolar, Z, Bartek, J (2008) Autocrine regulation of glioblastoma cell cycle progression, viability and radioresistance through the VEGF-VEGFR2 (KDR) interplay. *Cell Cycle* 7(16): 2553-2561.
- Kraus, WL, Montano, MM, Katzenellenbogen, BS (1993) Cloning of the rat progesterone receptor gene 5'-region and identification of two functionally distinct promoters. *Mol Endocrinol* 7(12): 1603-1616.
- Krieg, J, Hunter, T (1992) Identification of the two major epidermal growth factor-induced tyrosine phosphorylation sites in the microvillar core protein ezrin. *J Biol Chem* 267(27): 19258-19265.
- Kuan, CT, Wikstrand, CJ, Bigner, DD (2001) EGF mutant receptor vIII as a molecular target in cancer therapy. *Endocr Relat Cancer* 8(2): 83-96.
- Kurebayashi, J, Otsuki, T, Kunisue, H, Tanaka, K, Yamamoto, S, Sonoo, H (2000) Expression levels of estrogen receptor-alpha, estrogen receptor-beta, coactivators, and corepressors in breast cancer. *Clin Cancer Res* 6(2): 512-518.

- Lange, CA, Richer, JK, Shen, T, Horwitz, KB (1998) Convergence of progesterone and epidermal growth factor signaling in breast cancer. Potentiation of mitogen-activated protein kinase pathways. *J Biol Chem* 273(47): 31308-31316.
- Lange, CA, Yee, D (2009) Progesterona y cáncer de mama. *Revista del climaterio* 12(71): 153-165.
- Leo, C, Chen, JD (2000) The SRC family of nuclear receptor coactivators. *Gene* 245(1): 1-11.
- Leonhardt, SA, Altmann, M, Edwards, DP (1998) Agonist and antagonists induce homodimerization and mixed ligand heterodimerization of human progesterone receptors in vivo by a mammalian two-hybrid assay. *Mol Endocrinol* 12(12): 1914-1930.
- Leonhardt, SA, Edwards, DP (2002) Mechanism of action of progesterone antagonists. *Exp Biol Med (Maywood)* 227(11): 969-980.
- Leung, DW, Cachianes, G, Kuang, WJ, Goeddel, DV, Ferrara, N (1989) Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 246(4935): 1306-1309.
- Li, X, Wong, J, Tsai, SY, Tsai, MJ, O'Malley, BW (2003) Progesterone and glucocorticoid receptors recruit distinct coactivator complexes and promote distinct patterns of local chromatin modification. *Mol Cell Biol* 23(11): 3763-3773.
- Liang, Y, Hyder, SM (2005) Proliferation of endothelial and tumor epithelial cells by progestin-induced vascular endothelial growth factor from human breast cancer cells: paracrine and autocrine effects. *Endocrinology* 146(8): 3632-3641.
- Lockwood, CJ, Krikun, G, Runic, R, Schwartz, LB, Mesia, AF, Schatz, F (2000) Progestin-epidermal growth factor regulation of tissue factor expression during decidualization of human endometrial stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab* 85(1): 297-301.
- Loosfelt, H, Atger, M, Misrahi, M, Guiochon-Mantel, A, Meriel, C, Logeat, F, Benarous, R, Milgrom, E (1986) Cloning and sequence analysis of rabbit progesterone-receptor complementary DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83(23): 9045-9049.

- Louis, DN, Ohgaki, H, Wiestler, OD, Cavenee, WK, Burger, PC, Jouvet, A, Scheithauer, BW, Kleihues, P (2007) The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol* 114(2): 97-109.
- Maity, A, Pore, N, Lee, J, Solomon, D, O'Rourke, DM (2000) Epidermal growth factor receptor transcriptionally up-regulates vascular endothelial growth factor expression in human glioblastoma cells via a pathway involving phosphatidylinositol 3'-kinase and distinct from that induced by hypoxia. *Cancer Res* 60(20): 5879-5886.
- McKenna, NJ, Lanz, RB, O'Malley, BW (1999) Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocr Rev* 20(3): 321-344.
- McKinley, BP, Michalek, AM, Fenstermaker, RA, Plunkett, RJ (2000) The impact of age and sex on the incidence of glial tumors in New York state from 1976 to 1995. *J Neurosurg* 93(6): 932-939.
- McKusick-Nathans, Hopkins, J, Information, NCfB (2010) Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM (TM): National Library of Medicine (Bethesda, MD).
- Misiti, S, Schomburg, L, Yen, PM, Chin, WW (1998) Expression and hormonal regulation of coactivator and corepressor genes. *Endocrinology* 139(5): 2493-2500.
- Misrahi, M, Venencie, PY, Saugier-veber, P, Sar, S, Dessen, P, Milgrom, E (1993) Structure of the human progesterone receptor gene. *Biochim Biophys Acta* 1216(2): 289-292.
- Mitsudomi, T, Yatabe, Y (2012) Epidermal growth factor receptor in relation to tumor development: EGFR gene and cancer. *FEBS J* 277(2): 301-308.
- Mueller, MD, Vigne, JL, Pritts, EA, Chao, V, Dreher, E, Taylor, RN (2003) Progestins activate vascular endothelial growth factor gene transcription in endometrial adenocarcinoma cells. *Fertil Steril* 79(2): 386-392.
- Murphy, LC, Murphy, LJ, Shiu, RP (1988) Progestin regulation of EGF-receptor mRNA accumulation in T-47D human breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 150(1): 192-196.
- Musgrove, EA (2006) Cyclins: roles in mitogenic signaling and oncogenic transformation. *Growth Factors* 24(1): 13-19.

- Musgrove, EA, Hamilton, JA, Lee, CS, Sweeney, KJ, Watts, CK, Sutherland, RL (1993) Growth factor, steroid, and steroid antagonist regulation of cyclin gene expression associated with changes in T-47D human breast cancer cell cycle progression. *Mol Cell Biol* 13(6): 3577-3587.
- Musgrove, EA, Lee, CS, Sutherland, RL (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. *Mol Cell Biol* 11(10): 5032-5043.
- Nussey, S, Whitehead, S (2001) Principles of endocrinology. In: *Endocrinology. An Integrated Approach*. London: BIOS Scientific Publishers Limited.
- Ohgaki, H, Kleihues, P (2007) Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *Am J Pathol* 170(5): 1445-1453.
- Onate, SA, Tsai, SY, Tsai, MJ, O'Malley, BW (1995) Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily. *Science* 270(5240): 1354-1357.
- Peles, E, Lidar, Z, Simon, AJ, Grossman, R, Nass, D, Ram, Z (2004) Angiogenic factors in the cerebrospinal fluid of patients with astrocytic brain tumors. *Neurosurgery* 55(3): 562-567; discussion 567-568.
- Pérez, OL, Rodríguez, RE, Figueredo, RR, Barroso, GE (2001) Astrocitoma anaplásico y glioblastoma multiforme. Factores que influyen en la supervivencia. *Rev Cubana Cir* 40(2): 87-91.
- Plouët, J, Schilling, J, Gospodarowicz, D (1989) Isolation and characterization of a newly identified endothelial cell mitogen produced by AtT-20 cells. *EMBO J* 8(12): 3801-3806.
- Poltorak, Z, Cohen, T, Sivan, R, Kandelis, Y, Spira, G, Vlodaysky, I, Keshet, E, Neufeld, G (1997) VEGF145, a secreted vascular endothelial growth factor isoform that binds to extracellular matrix. *J Biol Chem* 272(11): 7151-7158.
- Pruitt, KD, Tatusova, T, Maglott, DR (2007) NCBI Reference Sequence (RefSeq): a curated non-redundant sequence database of genomes, transcripts and proteins Vol. 35, pp D61-65: *Nucleic Acids Res*.

- Qin, L, Liu, Z, Chen, H, Xu, J (2009) The steroid receptor coactivator-1 regulates twist expression and promotes breast cancer metastasis. *Cancer Res* 69(9): 3819-3827.
- Raaijmakers, HC, Versteegh, JE, Uitdehaag, JC (2009) The X-ray structure of RU486 bound to the progesterone receptor in a destabilized agonistic conformation. *J Biol Chem* 284(29): 19572-19579.
- Reiter, JL, Threadgill, DW, Eley, GD, Strunk, KE, Danielsen, AJ, Sinclair, CS, Pearsall, RS, Green, PJ, Yee, D, Lampland, AL, Balasubramaniam, S, Crossley, TD, Magnuson, TR, James, CD, Maihle, NJ (2001) Comparative genomic sequence analysis and isolation of human and mouse alternative EGFR transcripts encoding truncated receptor isoforms. *Genomics* 71(1): 1-20.
- Relf, M, LeJeune, S, Scott, PA, Fox, S, Smith, K, Leek, R, Moghaddam, A, Whitehouse, R, Bicknell, R, Harris, AL (1997) Expression of the angiogenic factors vascular endothelial cell growth factor, acidic and basic fibroblast growth factor, tumor growth factor beta-1, platelet-derived endothelial cell growth factor, placenta growth factor, and pleiotrophin in human primary breast cancer and its relation to angiogenesis. *Cancer Res* 57(5): 963-969.
- Reynolds, RK, Talavera, F, Roberts, JA, Hopkins, MP, Menon, KM (1990) Regulation of epidermal growth factor and insulin-like growth factor I receptors by estradiol and progesterone in normal and neoplastic endometrial cell cultures. *Gynecol Oncol* 38(3): 396-406.
- Rosen, LS (2005) VEGF-targeted therapy: therapeutic potential and recent advances. *Oncologist* 10(6): 382-391.
- Sallinen, SL, Sallinen, PK, Kononen, JT, Syrjakoski, KM, Nupponen, NN, Rantala, IS, Helen, PT, Helin, HJ, Haapasalo, HK (1999) Cyclin D1 expression in astrocytomas is associated with cell proliferation activity and patient prognosis. *J Pathol* 188(3): 289-293.
- Sarkar, C, Jain, A, Suri, V (2009a) Current concepts in the pathology and genetics of gliomas. *Indian J Cancer* 46(2): 108-119.
- Sarkar, C, Jain, A, Suri, V (2009b) Current concepts in the pathology and genetics of gliomas. *Indian J Cancer* 46(2): 108-119.

- Sartorius, CA, Melville, MY, Hovland, AR, Tung, L, Takimoto, GS, Horwitz, KB (1994) A third transactivation function (AF3) of human progesterone receptors located in the unique N-terminal segment of the B-isoform. *Mol Endocrinol* 8(10): 1347-1360.
- Schumacher, M, Guennoun, R (2009) Progesterone: Synthesis, Metabolism, Mechanisms of Action, and Effects in the Nervous System. An Overview. In: *Hormones, Brain and Behavior*, Pfaff, D, Arnold, A, Etgen, A, Fahrbach, S, Rubin, R (eds), 2 edn, pp 1506-1523. USA: Academic Press.
- Spitz, IM (2003) Progesterone antagonists and progesterone receptor modulators: an overview. *Steroids* 68(10-13): 981-993.
- Takano, S, Yoshii, Y, Kondo, S, Suzuki, H, Maruno, T, Shirai, S, Nose, T (1996) Concentration of vascular endothelial growth factor in the serum and tumor tissue of brain tumor patients. *Cancer Res* 56(9): 2185-2190.
- Tetel, MJ, Lange, CA (2009) Molecular Genomics of Progesterin Actions. In: *Hormones, Brain and Behavior*, Pfaff, D, Arnold, A, Etgen, A, Fahrbach, S, Rubin, R (eds), pp 1439-1465. USA: Academic Press.
- The-UniProt-Consortium (2010) The Universal Protein Resource (UniProt) in 2010 Vol. 38, pp D142-148: *Nucleic Acids Res*.
- Theveny, B, Bailly, A, Rauch, C, Rauch, M, Delain, E, Milgrom, E (1987) Association of DNA-bound progesterone receptors. *Nature* 329(6134): 79-81.
- Tischer, E, Mitchell, R, Hartman, T, Silva, M, Gospodarowicz, D, Fiddes, JC, Abraham, JA (1991) The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J Biol Chem* 266(18): 11947-11954.
- Tung, L, Abdel-Hafiz, H, Shen, T, Harvell, DM, Nitao, LK, Richer, JK, Sartorius, CA, Takimoto, GS, Horwitz, KB (2006) Progesterone receptors (PR)-B and -A regulate transcription by different mechanisms: AF-3 exerts regulatory control over coactivator binding to PR-B. *Mol Endocrinol* 20(11): 2656-2670.
- 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): 1256-1265.

- 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): 1244-1255.
- Viana-Pereira, M, Lopes, JM, Little, S, Milanezi, F, Basto, D, Pardal, F, Jones, C, Reis, RM (2008) Analysis of EGFR overexpression, EGFR gene amplification and the EGFRvIII mutation in Portuguese high-grade gliomas. *Anticancer Res* 28(2A): 913-920.
- Walsh, CA, Qin, L, Tien, JC, Young, LS, Xu, J (2012) The function of steroid receptor coactivator-1 in normal tissues and cancer. *Int J Biol Sci* 8(4): 470-485.
- Wang, J, Wang, Q, Cui, Y, Liu, ZY, Zhao, W, Wang, CL, Dong, Y, Hou, L, Hu, G, Luo, C, Chen, J, Lu, Y (2012) Knockdown of cyclin D1 inhibits proliferation, induces apoptosis, and attenuates the invasive capacity of human glioblastoma cells. *J Neurooncol* 106(3): 473-484.
- Wang, K, Yamamoto, H, Chin, JR, Werb, Z, Vu, TH (2004) Epidermal growth factor receptor-deficient mice have delayed primary endochondral ossification because of defective osteoclast recruitment. *J Biol Chem* 279(51): 53848-53856.
- Wang, S, Yuan, Y, Liao, L, Kuang, SQ, Tien, JC, O'Malley, BW, Xu, J (2009) Disruption of the SRC-1 gene in mice suppresses breast cancer metastasis without affecting primary tumor formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(1): 151-156.
- Westphal, U, Harding, GB (1973) Steroid-protein interactions. XXVII. Progesterone binding to polymers of human serum albumin. *Biochim Biophys Acta* 310(2): 518-527.
- Wu, J, Richer, J, Horwitz, KB, Hyder, SM (2004) Progestin-dependent induction of vascular endothelial growth factor in human breast cancer cells: preferential regulation by progesterone receptor B. *Cancer Res* 64(6): 2238-2244.
- Xu, J, Li, Q (2003) Review of the in vivo functions of the p160 steroid receptor coactivator family. *Mol Endocrinol* 17(9): 1681-1692.
- Xu, J, Qiu, Y, DeMayo, FJ, Tsai, SY, Tsai, MJ, O'Malley, BW (1998) Partial hormone resistance in mice with disruption of the steroid receptor coactivator-1 (SRC-1) gene. *Science* 279(5358): 1922-1925.

-
- Xu, J, Wu, RC, O'Malley, BW (2009) Normal and cancer-related functions of the p160 steroid receptor co-activator (SRC) family. *Nat Rev Cancer* 9(9): 615-630.
- Yang, EB, Wang, DF, Mack, P, Cheng, LY (1996) Genistein, a tyrosine kinase inhibitor, reduces EGF-induced EGF receptor internalization and degradation in human hepatoma HepG2 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 224(2): 309-317.
- Zhang, X, Gureasko, J, Shen, K, Cole, PA, Kuriyan, J (2006) An allosteric mechanism for activation of the kinase domain of epidermal growth factor receptor. *Cell* 125(6): 1137-1149.
- Zhao, S, Chen, X, Lu, X, Yu, Y, Feng, Y (2007) Epidermal growth factor receptor signaling enhanced by long-term medroxyprogesterone acetate treatment in endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol* 105(1): 45-54.
- Zhou, YH, Tan, F, Hess, KR, Yung, WK (2003) The expression of PAX6, PTEN, vascular endothelial growth factor, and epidermal growth factor receptor in gliomas: relationship to tumor grade and survival. *Clin Cancer Res* 9(9): 3369-3375.

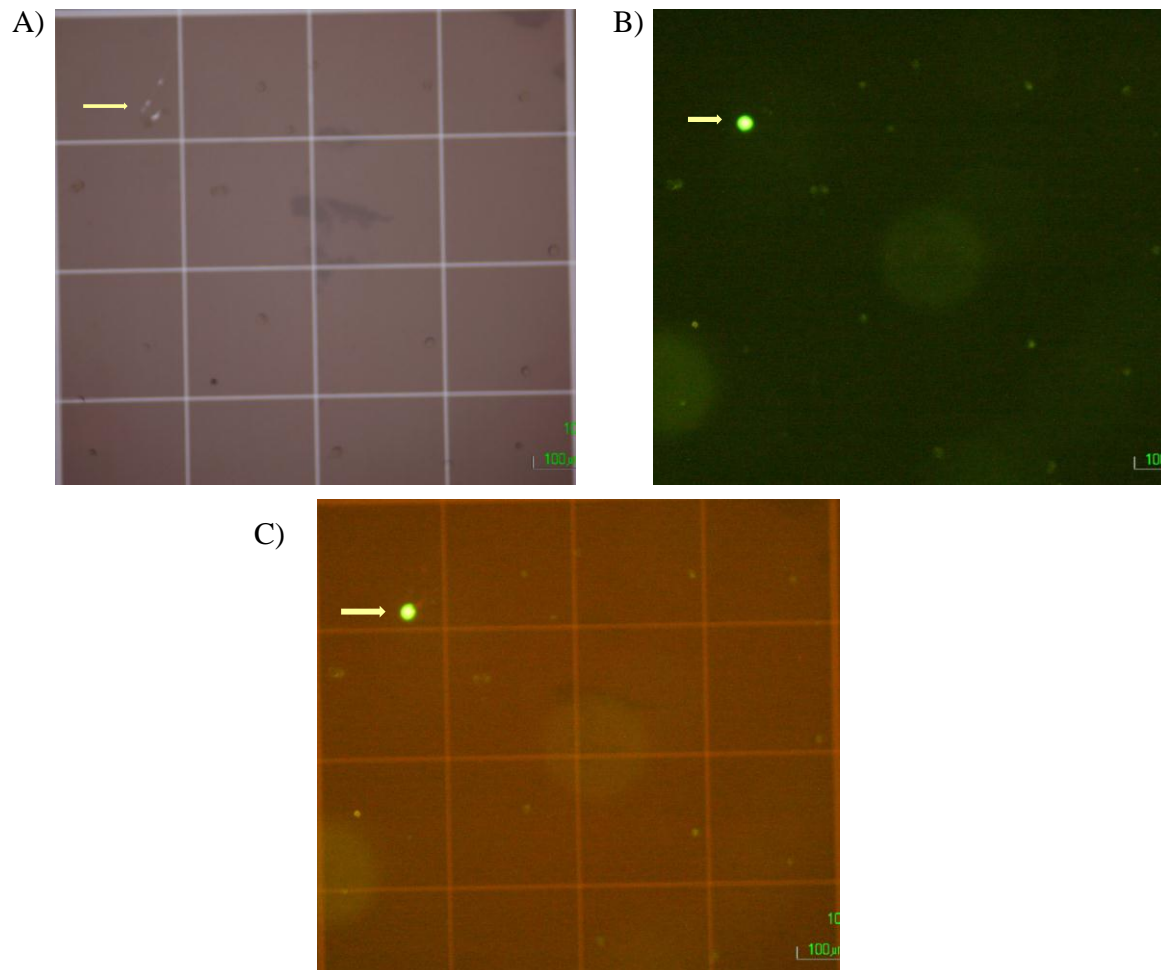
13. ANEXO**13.1. Línea celular D54 transfectada con pmaxGFP-FUGENE**

Figura 24. Control de transfección. Las células D54 fueron transfectadas con pmax-GFP utilizando FUGENE® HD **(A)**. Fluorescencia observada de las células que expresaron la proteína GFP **(B)**. Sobrelape de las imágenes obtenidas con microscopio de luz visible y de fluorescencia **(C)**.

13.2. PUBLICACIONES

13.2.1. Progesterone receptor and SRC-1 participate in the regulation of VEGF, EGFR and Cyclin D1 expression in human astrocytoma cell lines

Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology 132 (2012) 127–134



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jsbmb



Progesterone receptor and SRC-1 participate in the regulation of VEGF, EGFR and Cyclin D1 expression in human astrocytoma cell lines

Olivia Tania Hernández-Hernández, Tania Karina González-García, Ignacio Camacho-Arroyo*

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

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 December 2011

Received in revised form 9 April 2012

Accepted 12 April 2012

Keywords:

Progesterone receptor

VEGF

EGFR

Cyclin D1

Steroid receptor coactivator-1

ABSTRACT

Astrocytomas are the most common primary brain tumors in humans. It has been reported that vascular endothelial growth factor (VEGF), epidermal growth factor receptor (EGFR), cyclin D1 and progesterone receptor (PR) expression levels are elevated in patients with high-grade astrocytomas. Progesterone (P) regulates astrocytomas growth through its interaction with PR, which recruits coregulatory proteins such as steroid receptor coactivator-1 (SRC-1) that are required for efficient transcriptional activation. The regulation of VEGF, EGFR and cyclin D1 expression by P in human astrocytoma cells is not known. We studied the role of PR and SRC-1 in the expression of VEGF, EGFR and cyclin D1 mediated by P in human astrocytoma cell lines grade III (U373) and IV (D54). P significantly increased VEGF and EGFR mRNA expression after 12 h of treatment in D54 cells that was reflected at protein level 24 h after treatment. This effect was blocked by the PR antagonist, RU 486. In U373 cells cyclin D1 mRNA and protein expression was induced by P after 6 and 8 h of treatment, respectively, and this effect was blocked with RU 486. Transfection with short hairpin RNA targeting coactivator SRC-1 significantly reduced VEGF expression after 24 h of treatment. Collectively, our results indicate that P regulates VEGF and EGFR expression in D54 cells and cyclin D1 expression in U373 through PR, and that SRC-1 participates in the regulation of VEGF expression.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Astrocytomas are the most common primary brain tumors in humans. They are mainly found in adults between ages 30 and 50, and possess a high malignancy potential. The World Health Organization (WHO) classifies astrocytomas according to their histological characteristics in four groups (I–IV), and the survival of patients is inversely related to the tumor's grade [1,2].

The most common alterations in astrocytomas include somatic mutations in tumor suppressor genes, such as p53 and PTEN involved in the regulation of response to DNA damage, apoptosis and differentiation; overexpression of many growth factors and their receptors, such as vascular endothelial growth factor (VEGF) and epidermal growth factor receptor (EGFR), that regulate cell proliferation, angiogenesis and migration; and abnormalities in the cell cycle regulatory complex that includes the cyclin-dependent kinase (cdk) 4, cdk6, cyclin D1 and retinoblastoma (Rb) [2]. It has been reported that VEGF, EGFR and cyclin D1 expression levels are elevated in high-grade human astrocytomas [3–5].

Progesterone (P) participates in the regulation of several physiological and pathological processes [6]. P has been involved in the growth of brain tumors such as chordomas, meningiomas, craniopharyngiomas and astrocytomas [7–11]. P mainly elicits its effects by interaction with progesterone receptor (PR), which in humans is expressed as two isoforms: PR-A and PR-B with different function and regulation [12,13]. In astrocytomas, a direct relation between the content of PR and the tumor grade has been reported, suggesting that PR-positive tumors possess a high proliferative potential [8,14]. Our group has found that P induces cell proliferation in U373 and D54 human astrocytoma cell lines (grades III and IV, respectively), which is blocked by its antagonist RU 486, suggesting that P effects are mediated by PR [15] whose both isoforms have been detected in U373 and D54 cells [16,17]. It has been demonstrated that the expression of VEGF, EGFR and cyclin D1 directly correlates with the tumor grade and the recurrence of astrocytomas [3,5]. Several studies have established that natural and synthetic progestins increase VEGF, EGFR and cyclin D1 expression (mRNA and protein) in human endothelial, Ishikawa endometrial carcinoma and breast cancer cells (BT-474, T47D and HCC-1428) through a PR-mediated mechanism [18–21].

Classically, P binding to PR induces a change in receptor conformation, followed by dimerization and interaction with progesterone responsive elements (PRE) in the promoter or enhancer regions of target genes. In addition to directly contacting DNA,

* Corresponding author at: Facultad de Química, U. N. A. M., Ciudad Universitaria, Coyoacán 04510, D.F. México, Mexico. Tel.: +52 55 5622 3732; fax: +52 55 5616 2010.

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

PR can tether to other transcription factors, including specificity protein 1 (Sp1) and activator protein 1 (AP1), to regulate gene promoters that lack canonical PRE sequences [21]. To activate target gene transcription ligand-activated PR recruits coregulatory proteins, coactivators or corepressors that are required for efficient transcriptional regulation by steroid receptors [22]. Coactivators enhance the transcriptional activity of PR, through their chromatin remodeling activities that facilitate the assembly of a transcription initiation complex, by bridging nuclear receptors with the transcription machinery or by interacting with other coactivators [23].

Several families of coactivators have been characterized. The steroid receptor coactivator (SRC) family of 160 kDa consists of three members: SRC-1 (also called NCoA-1), SRC-2 (also called GRIP-1/NCoA-2) and SRC-3 (also called AIB1/ACTR/NCoA-3). These proteins are known to possess intrinsic histone acetyltransferase (HAT) activity and are capable of modifying chromatin by histone acetylation [24–26].

SRC proteins interact with several ligand-bound receptors including PR [27]. It has been demonstrated that SRC-1 is an important modulator of PR-mediated gene transcription. In T47D human breast cancer cell line, PR preferentially recruits SRC-1 after P administration [28,29]. Han et al. [29] used a transgenic mouse model (a PR activity indicator (PRAI) system that could monitor PR function *in vivo*) in which SRC-1 modulated PR activity in the uterus.

Several studies have demonstrated that SRC-1 expression is significantly increased in breast tumors and positively correlates with disease recurrence and poor disease-free survival [30]. It also participates in tumor progression and survival of several cancer cell lines [31–33]. It has been reported that disruption of SRC-1 gene in mice suppresses breast cancer metastasis [34]. Studies in our laboratory have demonstrated that SRC-1 is expressed in U373 and D54 cells, and its expression was up-regulated by P in D54 cells [17].

In this study we investigated whether VEGF, EGFR and cyclin D1 mRNA and protein expression could be regulated by P, and if PR and SRC-1 coactivator are involved in such regulation in U373 and D54 human astrocytoma cells.

2. Materials and methods

2.1. Cell culture and treatments

U373 and D54 human astrocytoma cell lines derived from human astrocytoma grades III (ATCC, Manassas, VA) and IV, generously obtained by Dr. Andres Gutiérrez from Dr. Sontheimer (Birmingham, Alabama) laboratory, were used. 1×10^6 cells were plated in 10 cm dishes and maintained in Dulbecco's modification of Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 1 mM pyruvate, 2 mM glutamine, 0.1 mM non-essential amino acids (GIBCO N.Y.) for 24 h. Medium was changed by phenol red-free DMEM medium supplemented with 10% charcoal stripped serum FBS (sFBS) (Hyclone, Utah), 1 mM pyruvate, 2 mM glutamine, 0.1 mM non-essential amino acids (GIBCO N.Y.) at 37 °C under a 95% air, 5% CO₂ atmosphere during 24 h. Then, the following treatments were applied for 6, 12, 24 and 48 h: (a) vehicle (V; 0.02% cyclodextrin in sterile water); (b) P (10 nM); (c) P followed by its antagonist RU 486 (1 μM); (d) RU 486. Cyclodextrin, P and RU 486 were purchased from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO). For cyclin D1 expression experiments, cells were synchronized in phenol red-free DMEM without sFBS for 48 h. Then, the treatments were applied for 6, 12, 24 and 48 h to determine the expression of cyclin D1 at mRNA levels. For cyclin D1 protein expression experiment, cells were treated for 8 h, because, it has been demonstrated that P induces the expression of cyclin D1 mRNA 3–6 h

after treatment, and this effect is immediately reflected at protein levels and returned to control levels by 12 h [35].

2.2. Total RNA extraction and RT-PCR

Total RNA was isolated from U373 and D54 cells 6, 12, 24 and 48 h after treatments with the single-step method based on guanidine isothiocyanate/phenol/chloroform extraction according to the TRIzol Reagent manufacturer's protocol. The first-strand cDNA was synthesized from 2 μg of total RNA by using SuperScript II reverse transcription (Invitrogen) and oligo (dT)₁₈ primers according to its protocol. Two μl of RT reaction was subjected to PCR in order to simultaneously amplify a gene fragment of VEGF, EGFR, cyclin D1 and 18S ribosomal RNA. This was used as an internal control. The sequences of the specific primers for VEGF amplification fragment (from +2601 to +2844) were 5'-CTTCGCTACTCTCACCTGCTT-3' in the sense primer and 5'-CAACCACTCACACACACAAC-3' in the antisense; for EGFR amplification region (from +1189 to +1412) were 5'-AGCTATGAGATGGAGGAGGAGC-3' in the sense and 5'-GGATCCAGAGGAGGAGTATGTG-3' in the antisense; and for cyclin D1 amplification region (from +1627 to +1783) were 5'-CTGTAGTGGGGTTCTAGGCATC-3' in the sense and 5'-CACGCTACGCTACTGTAACCA-3'. The 25 μl PCR reaction included: 2 μl of previously synthesized cDNA, 2.5 μl 10× buffer PCR, 1.25 mM MgCl₂, 0.25 mM of each dNTP, 1 μM of each primer, and 2.5 units of Taq DNA polymerase. Negative controls without RNA and with non-retrotranscribed RNA were included in all the experiments. After the initial denaturation step at 94 °C for 5 min, PCR reaction was performed for 25 cycles. The cycle profile for VEGF, EGFR, cyclin D1 and 18S amplification was: 1 min at 94 °C, 1 min at 56 °C and 1 min at 72 °C. 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 analysed together throughout the experiments. 25 μl of PCR products were separated on 2% agarose gel and stained with ethidium bromide. The image was captured under a UV transilluminator. The intensity of VEGF, EGFR, cyclin D1 and 18S bands was quantified by densitometry using the Chemilmager 4400 software (Alpha Innotech Corporation). Gene expression levels were normalized to those of 18S.

2.3. Protein extraction and Western blotting

After 24 and 48 h of treatment cells were homogenized in TDG lysis buffer with protease inhibitors (10 mM Tris-HCl, 1 mM dithiothreitol, 30% glycerol, 1% Triton X-100, 15 mM sodium azide, 1 mM EDTA, 4 μg/ml leupeptin, 22 μg/ml aprotinin, 1 mM PMSF and 1 mM sodium orthovanadate). Proteins were obtained by centrifugation at 20,000 × g, at 4 °C for 15 min. Proteins (100 μg) were separated by electrophoresis on 6% (SRC-1 and EGFR) or 12% (VEGF and cyclin D1) SDS-PAGE at 60 volts. Colored and enhanced chemiluminescence markers (Bio Rad, CA, USA and Gibco-BRL, Maryland) were included for size determination. Gels were transferred 2 h to nitrocellulose membranes (Amersham, NJ, USA) 140 mA, at room temperature in semi dry conditions, which were blocked at room temperature with 5% non-fat dry milk and 0.5% bovine serum albumin for 2 h. Membranes were then incubated with 0.5 μg/ml of antibodies against SRC-1 (Upstate 05-522; mouse monoclonal), VEGF (Santa Cruz sc-152; rabbit polyclonal), EGFR (Santa Cruz sc-03; rabbit polyclonal), cyclin D1 (Santa Cruz sc-8396; mouse monoclonal) at 4 °C overnight. Blots were then incubated with a 1:5000 dilution secondary antibody conjugated to horseradish peroxidase (anti-rabbit or anti-mouse Santa Cruz Biotechnology) for 1 h. Protein-antibody complexes were revealed by enhanced chemiluminescence (ECL) detection (Amersham, NJ).

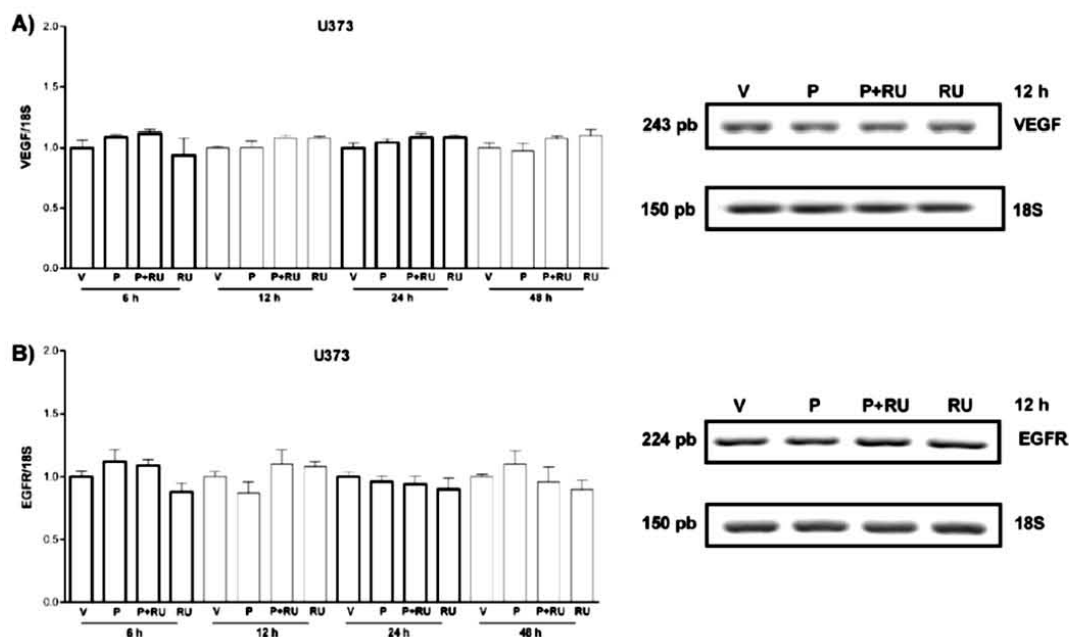


Fig. 1. Progesterone effects on VEGF and EGFR mRNA expression in U373 human astrocytoma cell line. Cells were treated with vehicle (V; 0.02% cyclodextrin in sterile water), progesterone (P; 10 nM), P followed by PR antagonist RU 486 (P+RU; 1 μ M) or RU for 6, 12, 24 and 48 h. RNA was obtained, reverse transcribed and PCR conducted using primers for VEGF, EGFR or 18S (used for normalization). RT-PCR analysis of VEGF (A) and EGFR mRNA (B). Densitometric analysis and representative images are shown. Results are expressed as mean \pm S.E.M. of four independent experiments.

To correct for differences in the amount of total protein loaded in each lane SRC-1, VEGF, EGFR and cyclin D1 protein content was normalized to that of α -tubulin. Blots were stripped with glycine (0.1 M, pH 2.5, 0.5% SDS) at 37 $^{\circ}$ C for 30 min, and incubated with a 1:10,000 dilution mouse α -tubulin monoclonal antibody (Sigma T9026, Saint Louis, MO) at 4 $^{\circ}$ C overnight. Blots were incubated with a 1:10,000 dilution goat anti-mouse IgG conjugated to horseradish peroxidase (Santa Cruz sc-2033) for 45 min at room temperature. Protein-antibody complexes were revealed by ECL detection. The intensity of SRC-1, VEGF, EGFR, cyclin D1 and α -tubulin signals was quantified by densitometry using the Chemilmager 4400 software (Alpha Innotech Corporation).

2.4. SRC-1 knockdown

Two interference RNAs were purchased from Santa Cruz Biotechnology (CA, USA): one short hairpin RNA (shRNA) targeting coactivator SRC-1 (shSRC-1) and one shRNA control (shControl). One day before transfection, 5×10^5 D54 cells were plated in 10 cm dishes and maintained in DMEM for reaching 50–60% confluent at time of transfection. For the transfection of each sample, shRNA-FUGENE[®] (Roche, Basel, Switzerland) complexes were prepared as follows: 2 μ g of shSRC-1 or shControl was diluted in 100 μ l of DMEM without FBS and 18 μ l of FUGENE[®] was diluted in 100 μ l of DMEM without FBS. After 5 min incubation, the diluted shRNA was combined with the diluted FUGENE[®], mixed gently and incubated for 30 min at room temperature. The shRNA-FUGENE[®] complexes were added to each dish containing cells maintained in DMEM without antibiotics and incubated at 37 $^{\circ}$ C for 12 h. Medium was changed by phenol red-free DMEM medium supplemented with 10% sFBS and 24 h later, cells were treated, collected and whole cell lysates were used to determine protein expression of VEGF and EGFR by Western blot.

2.5. Statistical analysis

Data were analysed by one-way (hormone treatment) or two-way (shSRC-1 and hormone treatment) ANOVA followed by Tukey or Bonferroni posthoc tests, respectively, by using the Statistical Package for the Social Sciences 12.0 for Windows (SPSS Inc., Chicago, IL). $P < 0.05$ was considered as statistically significant.

3. Results

3.1. Effects of P and RU 486 on VEGF, EGFR and cyclin D1 expression in U373 and D54 human astrocytoma cell lines

We investigated the expression of VEGF, EGFR and cyclin D1 at mRNA and protein levels in U373 and D54 cell lines treated with P or RU 486 or with a combination of both by RT-PCR and Western blot. In RT-PCR experiments single bands of 243, 224, 158 and 150 pb corresponding to the expected size fragments of VEGF, EGR, cyclin D1 and 18S were observed. No bands were observed in the negative controls (without RNA and with non-retrotranscribed RNA). In Western blot experiments VEGF, EGFR and cyclin D1 were detected as bands of 27, 150, 35 kDa, while α -tubulin was detected as a band of 55 kDa.

We found that VEGF and EGFR mRNA expression was not regulated by P in U373 cells (Fig. 1A and B). In contrast, in D54 cells P significantly increased VEGF and EGFR mRNA expression after 12 h of treatment. This effect was blocked with RU 486 (Fig. 2A and B). P increased VEGF and EGFR protein content after 24 h of treatment, and this increase was also blocked with RU 486 (Fig. 3A and B), whereas in U373 cells P had no significant effects (data not shown). In D54 cells maintained in DMEM with phenol red and FBS containing steroids, we also found that P induced

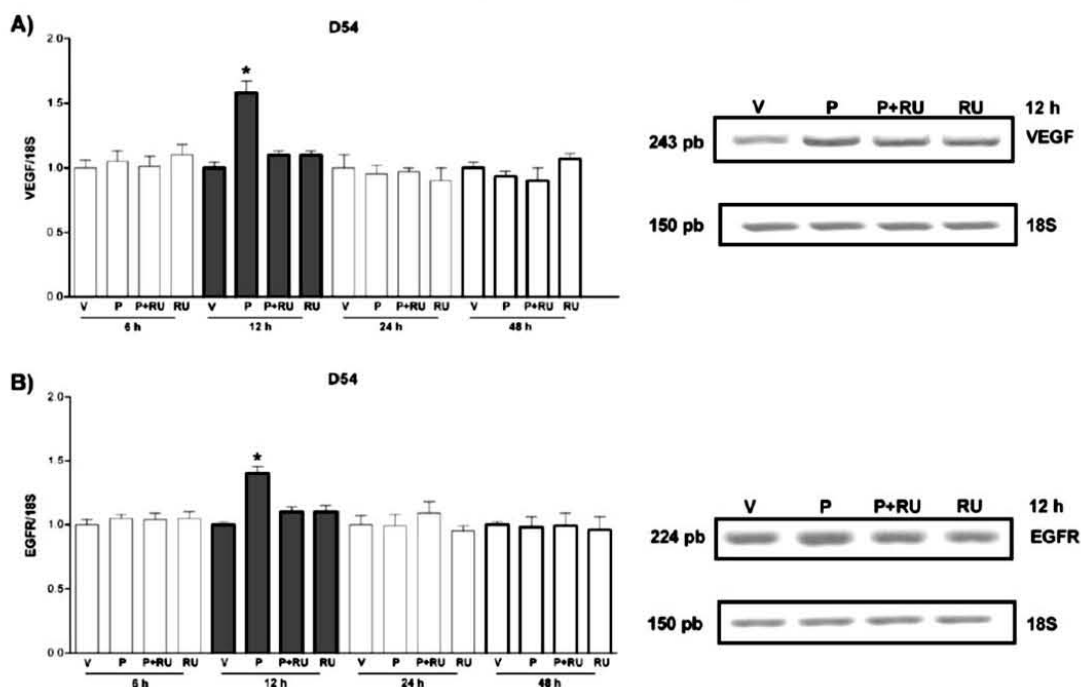


Fig. 2. Progesterone effects on VEGF and EGFR mRNA expression in D54 human astrocytoma cell line. Cells were treated with vehicle (V), progesterone (P; 10 nM), P + RU 486 (RU; 1 μ M) or RU for 6, 12, 24 and 48 h. RNA was obtained, reverse transcribed and PCR conducted using primers for VEGF, EGFR or 18S. RT-PCR analysis of VEGF (A) and EGFR mRNA (B). Densitometric analysis and representative images are shown. Results are expressed as mean \pm S.E.M. of four independent experiments. * $P < 0.05$ vs. all groups. Bars on the graphs that are shaded darker denote a significant effect of P.

VEGF and EGFR protein expression 24 h after treatment, and that this effect was blocked with RU 486, whereas the treatment with RU486 alone did not exert significant effects on basal expression of VEGF and EGFR (Supplementary Fig. 1). In U373 cells, P induced an increase in cyclin D1 mRNA expression after 6 h that was blocked with RU 486 (Fig. 4A). This effect was reflected at protein level 8 h after treatment (Fig. 4B). Cyclin D1 expression was not regulated by P in D54 cells (Fig. 4C). Collectively, our results indicate that P differentially regulates VEGF and EGFR expression in D54 cells and cyclin D1 expression in U373 through PR activation.

3.2. Effect of SRC-1 on PR-mediated VEGF and EGFR expression in D54 cells

We studied the effect of SRC-1 on the stimulation of VEGF and EGFR expression by P in D54 cells using shRNA for SRC-1 (shSRC-1). We confirmed by Western blot that the protein content of SRC-1 in D54 cells transfected with shSRC-1 was significantly lower (30%) than that in D54 cells transfected with shControl (Fig. 5A). In shControl-transfected D54 cells, P treatment for 24 h produced the expected result of an increased in VEGF and EGFR protein expression (Fig. 5B and C). Transfection with shSRC-1 significantly reduced basal (vehicle) and P-induced VEGF protein content after 24 h of treatment (Fig. 5B). Two-way ANOVA revealed that P treatment and transfection with shSRC-1 produced significant effects on VEGF expression (treatment: $F(1, 32) = 63.52$, $P < 0.001$; transfection: $F(1, 32) = 28.52$, $P < 0.001$) without significant interaction between treatment and transfection. On the other hand, transfection with shSRC-1 had no effect on the P-induced EGFR protein expression (Fig. 5C).

4. Discussion

The regulation of cell growth and proliferation by P is associated with modulation of the expression of genes involved in the control of cell cycle, apoptosis and angiogenesis [35]. PR modulates target gene transcription by recruiting components of the basal transcriptional machinery and by interacting with coactivator proteins such as SRC-1 [22]. The growth and proliferation of many human cancers are P-dependent [36,37]. Our group has reported that P regulates astrocytomas cell growth through the interaction with PR [15].

In this study, we determined the regulation of VEGF, EGFR and cyclin D1 expression by P through PR and SRC-1 in U373 and D54 cells. We found that P significantly increased VEGF and EGFR mRNA expression 12 h after its administration in D54 cells. This increase was reflected at VEGF and EGFR protein content 12 h later in these cells. This effect was blocked with the PR antagonist RU 486. It has been reported that regulation of the expression of growth factors or their receptors by P, could provide a mechanism by which P might increase the rate of proliferation of normal and cancer cells [38]. Growth factors, such as EGF and VEGF regulate cell growth via the initiation of mitogenic intracellular signal transduction pathways after binding to high-affinity tyrosine kinase receptors, such as EGFR on the cell surface [35,39]. Many of the proliferative gene targets of PR such as EGFR does not contain a canonical PRE in their promoter region and may thus be regulated by non-classical PR tethering and/or rapid signaling independent of direct PR DNA binding [21,40].

EGFR is involved in the regulation of proliferation and differentiation in various cell types [41]. It has been determined that R5020 a PR agonist, induces EGFR-, cSrc-, and MAPK-dependent

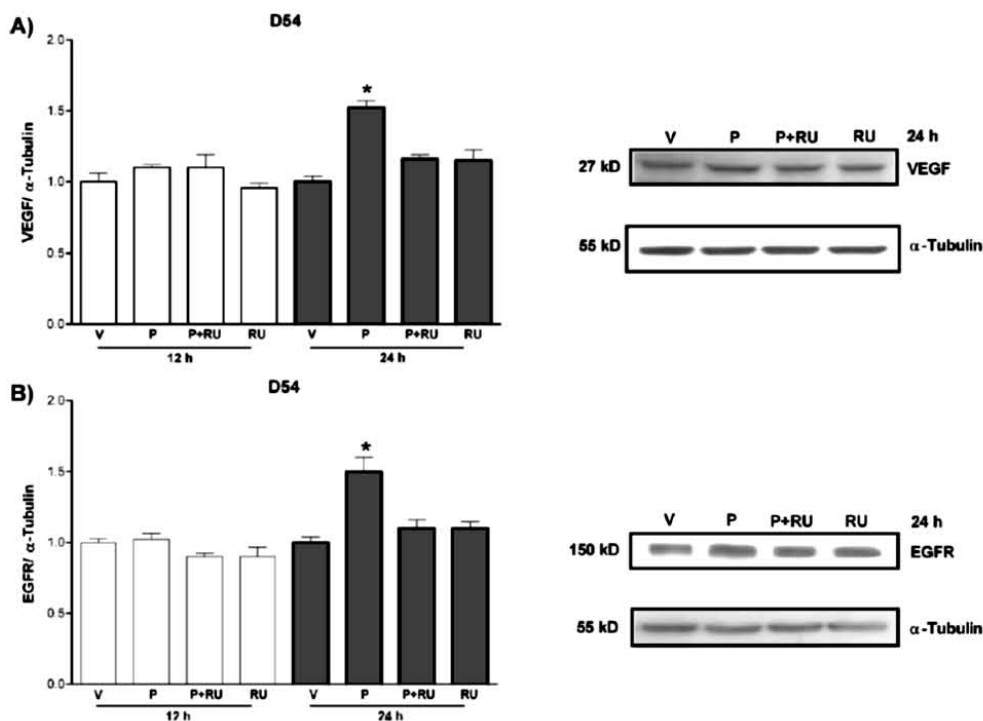


Fig. 3. P regulation of VEGF and EGFR protein content through PR. Western blot analysis of VEGF (A) and EGFR protein content (B) in D54 cells treated with V, P (10 nM), P+RU (1 μM) or RU for 12 and 24 h. D54 cells were lysed and proteins (100 μg) were separated by electrophoresis on 12% (VEGF) or 6% (EGFR) SDS-PAGE gels that were transferred to nitrocellulose membranes and then incubated with antibodies for VEGF, EGFR or α-tubulin (used for normalization). Densitometric analysis and representative images are shown. Results are expressed as mean ± S.E.M. of four independent experiments. * $P < 0.05$ vs. all groups. Bars on the graphs that are shaded darker denote a significant effect of P.

phosphorylation of PR-B at Ser345 in T47D breast cancer cells stably expressing PR-B (T47PR-B). Progesterone increased EGFR mRNA and protein expression in PR-B (Ser345-phosphorylated) expressing cells but not in PR-null or containing Ser345A phospho-mutant PR-B. Besides, the inhibition of c-Src and EGFR kinase activity with PP2 and AG1478 blocked the up-regulation of EGFR in R5020-treated cells stably expressing PR-B [21,42]. The EGFR promoter does not contain canonical PRE; however, the presence of numerous Sp1 sites may provide a mechanism for PR regulation of EGFR expression *via* Sp1 [43]. Also, it has been reported that Ser345-phosphorylated PR-B strongly associates with Sp1 transcription factor to regulate EGFR expression. Inhibitors of EGFR, c-Src or MAPK activities blocked PR tethering to Sp1 and progestin-stimulated S-phase entry [21].

VEGF is a fundamental regulator of normal and abnormal angiogenesis [44]. It has been demonstrated that many tumor cells produce VEGF, including astrocytomas [5,45]. It has been shown that natural and synthetic progestins, such as R5020 and medroxyprogesterone acetate (MPA) increased VEGF mRNA and protein levels in human breast cancer cells (BT-474, T47D and HCC-1428), and human endometrium, while the PR antagonist, RU 486, suppressed progestin-dependent VEGF induction, indicating that this response is PR dependent [18,20,46]. In Ishikawa cells derived from human endometrial adenocarcinoma, cotransfected with human VEGF gene promoter and expression vectors encoding either PR-A or PR-B, treatment with R5020 and MPA resulted in a significant increase in luciferase activity, whereas pretreatment with RU 486 or the PR pure antagonist (ZK299) drastically reduced the progestin effect. Three consensus PRE have been identified in

the VEGF promoter region. PRE1 (TGTACA) from -1865 to 1860, PRE2 (TGTACA) from -716 to -711, and PRE3 (TGTCT) from +679 to +684 [18]. It has also been determined that ligand-activated PR modulates the promoter activity of some genes through Sp1 and AP-1 sites. More than 6 AP-1 sites and 10 Sp1 sites are located in the VEGF gene promoter, and these are widely distributed across the 3-kb stretch of the promoter sequence [18,47]. Therefore, other response elements within the VEGF gene promoter sequence and other transcription factors appear to play an important role in the regulation of VEGF gene transcription by P.

We found that only in U373 cells P increases cyclin D1 mRNA and protein expression. Several G1-S phase cell cycle proteins are transiently up-regulated by P including c-fos, c-myc, and cyclin D1, leading to accumulation and increased activity of cyclin dependent kinase 4 (Cdk4)/cyclin D1 complex and hyperphosphorylation of the retinoblastoma protein. In PR-positive T47D cells, cyclin D1 expression was induced by treatment with P and synthetic progestins (R5020 and ORG 2058) [35]. It has been determined that progestin-stimulated cells begin to enter S phase after approximately 8 h of P treatment and that progestin effects on cell cycle progression can be antagonized by the addition of the PR antagonist, RU 486, suggesting that induction of cyclin D1 expression is mediated by PR [40]. The cyclin D1 gene lacks PRE sequences, but the cyclin D1 promoter has regulatory elements for multiple transcription factors including AP-1, Sp1 and nuclear factor kappa B (NF-κB), that could be nuclear targets of progestin-activated signaling pathways [48].

Our data suggest that P differentially regulates VEGF, EGFR and cyclin D1 expression in astrocytoma cell lines. Differences in the

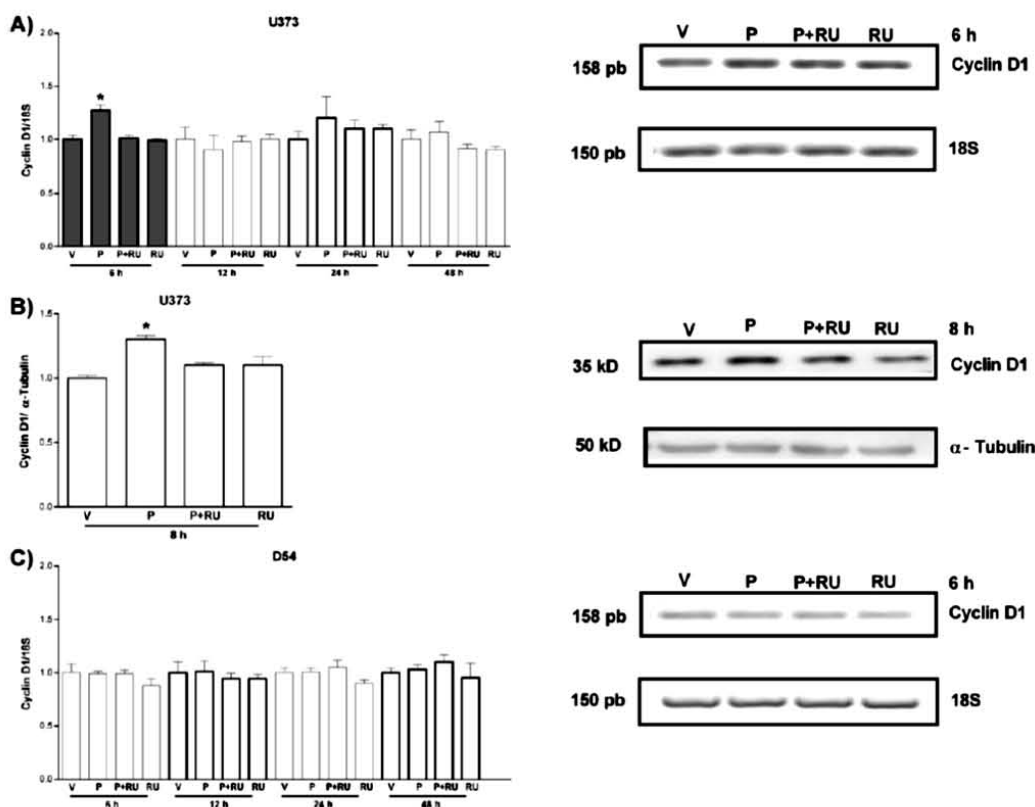


Fig. 4. Regulation of cyclin D1 mRNA and protein expression by P through PR. RT-PCR analysis of cyclin D1 mRNA in U373 (A) and D54 cells (C) treated with vehicle (V), progesterone (P; 10 nM), P+RU 486 (RU; 1 μ M) or RU for 6, 12, 24 and 48 h. RNA was extracted and RT-PCR assays were performed to detect cyclin D1 or 18S. (B) Western blot analysis of cyclin D1 protein content in U373 cells treated with V, P (10 nM), P+RU (1 μ M) or RU for 8 h. U373 cells were lysed and proteins (100 μ g) were separated by electrophoresis on 12% SDS-PAGE gel. Proteins were detected using antibodies for cyclin D1 or α -tubulin. Densitometric analysis and representative images are shown. Results are expressed as mean \pm S.E.M. of four independent experiments. * P <0.05 vs. all groups. Bars on the graphs that are shaded darker denote a significant effect of P.

regulation of these proteins between U373 and D54 cells could be related to the tumor grade they derive from (U373, grade III; and D54, grade IV). U373 cells exhibit histological characteristic of malignancy, including nuclear atypia and high proliferation [15,16,49]. At a molecular level grade III tumors have many genetic alterations of target cell cycle regulatory genes such as cyclin D1 [2] whose expression has been related to an active and constant cell proliferation [3,50]. In contrast, D54 cells exhibit more advanced features of malignancy, including significant proliferation and invasive properties [15,49]. A higher evolution grade in tumors implies a more dedifferentiated phenotype, which correlates with an over-expression of growth factors and their receptors [2,51]. It has been reported that the induction of the expression of VEGF and EGFR enhances tumorigenic behavior of human astrocytoma cells by increasing proliferation, angiogenesis and invasion [51]. Previous studies in our laboratory have demonstrated that PR isoforms expression pattern was different in U373 and D54 cells. Thus, PR-B was the predominant isoform in U373 cells, whereas in D54 cells PR-A was the predominant one [16,17]. This suggests that PR isoforms should exert a differential role in the regulation of VEGF, EGFR and cyclin D1 by P in human astrocytoma cells. In fact, it has been reported that PR-A and PR-B modify the expression of different genes in the uterus and breast cancer cells [52]. We have recently reported that P significantly increases SRC-1 expression in D54 cells but not in U373 cells [17]. This suggests a cell-specific

modulation of SRC-1 expression by P in astrocytomas that should be related to an increase in transcriptional activation of PR in D54 cells.

We found that the protein content of SRC-1 in D54 cells transfected with shSRC-1 was significantly lower than that in D54 cells transfected with shControl. Interestingly, we observed that P increases SRC-1 protein content in D54 cells transfected with shSRC-1 and shControl. Consistent with these observations in our laboratory we have demonstrated that P increases SRC-1 mRNA expression in D54 cells 12 h after its administration, this increase was reflected at SRC-1 protein content 12 h later [17]. This could limit the effects of SRC-1 depletion by shSRC-1 transfection.

Our data indicate that SRC-1 depletion did not influence the P-induced EGFR expression, suggesting that SRC-1 is not required for PR-mediated EGFR mRNA transcription. It is possible that other coactivators such as SRC-2 and SRC-3 participate in this regulation. In this regard it would be interesting to compare the effects of SRC-2 and SRC-3 depletion on the P-induced EGFR expression.

We found that shSRC-1 transfection significantly reduced VEGF protein expression in D54 cells. Several studies have demonstrated the physiological and pathophysiological importance of SRC-1 expression levels [30,34,53,54], and SRC-1 is a key modulator of PR-mediated gene transcription [52,53,55]. Cell regulation of SRC-1 levels seems to be also critical for tumorigenesis, and studies have demonstrated that SRC-1 expression is significantly increased in breast tumors and positively correlates with disease

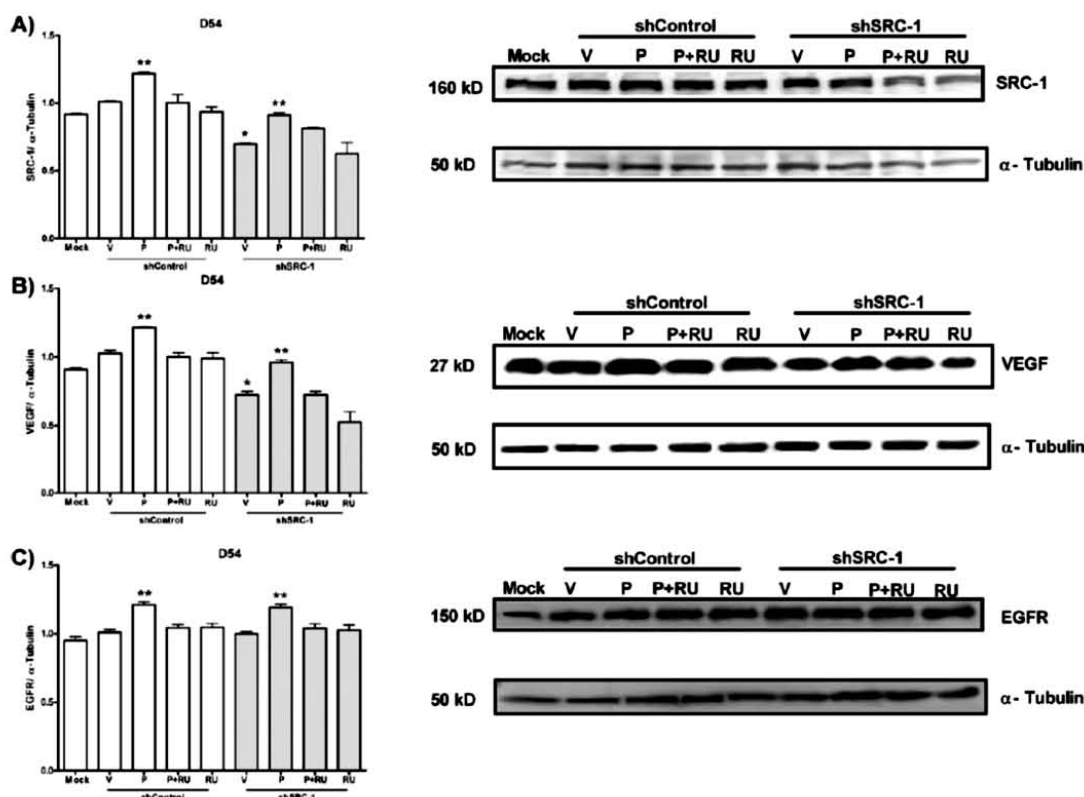


Fig. 5. Effects of SRC-1 silencing on P-stimulated VEGF and EGFR expression. D54 cells were transfected with shControl or shSRC-1, and 12 h after transfection, medium was replaced with phenol red-free DMEM supplemented with 10% sFBS, and then treated with vehicle (V), progesterone (P; 10 nM), P + RU 486 (RU; 1 μ M) or RU for 24 h. Subsequently, expression of SRC-1 (A), VEGF (B), EGFR (C) and α -tubulin was assessed by Western blot. Total proteins were obtained and Western blot assays were performed to detect SRC-1, VEGF, EGFR and α -tubulin. Densitometric analysis and representative images are shown. Results are expressed as mean \pm S.E.M. of three independent experiments. Two-way ANOVA indicates significant effects for P treatment ($F(1, 32) = 63.52; P < 0.001$) and transfection with shSRC-1 ($F(1, 32) = 28.52; P < 0.001$) on VEGF expression without significant interaction between factors. * $P < 0.001$ vs. all groups with shControl, ** $P < 0.001$ vs. V.

recurrence and poor disease-free survival [30]. It has been demonstrated *in vivo* that SRC-1 promotes breast cancer invasiveness and metastasis by coactivating PEA3-mediated Twist expression (a master regulator of metastasis) [54]. Our data suggest that SRC-1 enhances VEGF expression by serving as a coactivator to regulate VEGF mRNA transcription. Intervention of SRC-1 function may provide new strategies to inhibit growth of astrocytomas.

In conclusion, our results indicate that P differentially regulates VEGF and EGFR expression in D54 cells and cyclin D1 expression in U373 through PR, and that SRC-1 participates in the regulation of VEGF expression.

Acknowledgement

This work was supported by Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) IN212611-3, DGAPA, UNAM México. We thank Posgrado en Ciencias Biomédicas, UNAM. OTHH is a PhD student of this program.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsbmb.2012.04.005>.

References

- [1] C. Dumas-Duport, B. Scheithauer, J. O'Fallon, P. Kelly, Grading of astrocytomas. A simple and reproducible method, *Cancer* 62 (10) (1988) 2152–2165.
- [2] D.N. Louis, Molecular pathology of malignant gliomas, *Annual Review of Pathology* 1 (2006) 97–117.
- [3] S.L. Sallinen, P.K. Sallinen, J.T. Kononen, K.M. Syrjäkoski, N.N. Nupponen, I.S. Rantala, P.T. Helen, H.J. Helin, H.K. Haapasalo, Cyclin D1 expression in astrocytomas is associated with cell proliferation activity and patient prognosis, *Journal of Pathology* 188 (3) (1999) 289–293.
- [4] S. Godard, G. Getz, M. Delorenzi, P. Farmer, H. Kobayashi, I. Desbaillets, M. Nozaki, A.C. Diserens, M.F. Hamou, P.Y. Dietrich, L. Regli, R.C. Janzer, P. Bucher, R. Stupp, N. de Tribolet, E. Domany, M.E. Hegi, Classification of human astrocytic gliomas on the basis of gene expression: a correlated group of genes with angiogenic activity emerges as a strong predictor of subtypes, *Cancer Research* 63 (20) (2003) 6613–6625.
- [5] P. Knizetova, J. Ehrmann, A. Hlobilkova, I. Vancova, O. Kalita, Z. Kolar, J. Bartek, Autocrine regulation of glioblastoma cell cycle progression, viability and radioresistance through the VEGF-VEGFR2 (KDR) interplay, *Cell Cycle* 7 (16) (2008) 2553–2561.
- [6] R.D. Brinton, R.F. Thompson, M.R. Foy, M. Baudry, J. Wang, C.E. Finch, T.E. Morgan, C.J. Pike, W.J. Mack, F.Z. Stanczyk, J. Nilsen, Progesterone receptors: form and function in brain, *Frontiers in Neuroendocrinology* 29 (2) (2008) 313–339.
- [7] R.S. Carroll, J. Zhang, K. Dashner, M. Sar, P.M. Black, Steroid hormone receptors in astrocytic neoplasms, *Neurosurgery* 37 (3) (1995) 496–503.
- [8] H. Khalid, S. Shibata, M. Kishikawa, A. Yasunaga, M. Iseki, T. Hiura, Immunohistochemical analysis of progesterone receptor and Ki-67 labeling index in astrocytic tumors, *Cancer* 80 (11) (1997) 2133–2140.
- [9] F. Bozzetti, P. Boracchi, A. Costa, L. Cozzaglio, A. Battista, A. Giori, G. La Monica, R. Silvestrini, Relationship between nutritional status and tumor growth in humans, *Tumori* 81 (1) (1995) 1–6.

13.2.3. Role of Progesterone in human astrocytomas growth.

Current Topics in Medicinal Chemistry, 2011, 11, 1663-1667

1663

Role of Progesterone in Human Astrocytomas Growth

Edith Cabrera-Muñoz, Olivia Tania Hernández-Hernández and Ignacio Camacho-Arroyo*

Facultad de Química, Departamento de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F. México

Abstract: Progesterone (P) participates in the regulation of several reproductive processes such as ovulation and sexual behavior, however, this hormone also participates in non-reproductive processes, such as neural excitability, learning and memory, and pathological processes such as cancer. P mainly elicits its effects by interaction with its intracellular receptor (PR), which is a ligand-activated transcription factor that modifies the expression of genes involved in the control of cell growth and proliferation, such as vascular endothelial growth factor and epidermal growth factor receptor. Two PR isoforms have been reported: PR-B and PR-A, which present different function and regulation. PR isoforms are expressed in U373 and D54 cell lines, which are derived from grades III and IV of human astrocytomas, respectively. In both cell lines P increases the number of astrocytomas cells. The PR antagonist, RU486, blocked P effects and its treatment alone significantly reduced human astrocytomas cell growth *in vitro*. The over-expression of PR-A in U373 cells significantly reduced P effects. These data suggest that P regulates human astrocytomas cell proliferation through the interaction with PR.

Keywords: Progesterone, astrocytomas, progesterone receptor isoforms, cell growth.

INTRODUCTION

Progesterone (P) participates in the regulation of several physiological and pathological processes in the brain of mammals. This hormone has been involved in the growth of brain tumors such as chordomas, meningiomas and astrocytomas [1-5]. Astrocytomas are the most frequent primary brain tumors and constitute a leading cause of cancer related deaths.

P mainly elicits its effects by interaction with its intracellular receptor (PR), which is a ligand-activated transcription factor. PR activity is fundamental in development, growth and proliferation of tumors [1, 6-8]. In this paper we present an overview of the research about the role of P in cell growth of human astrocytomas.

GENOMIC MECHANISM OF ACTION OF PROGESTERONE

Many P actions are mediated by PR which is a ligand-activated transcription factor that regulate the expression of several genes involved in metabolism, development and reproduction as well as cell cycle progression [6, 8, 9].

Two main PR isoforms have been reported in humans: a full-length form (PR-B, 114 kDa) and an N-terminal truncated one (PR-A, 94 kDa). PR isoforms are encoded by the same gene, but they are regulated by distinct promoters [6, 8, 9]. In general, PR-B is a much stronger transcriptional activator than PR-A [7, 10].

The genomic mechanism of action involves the interaction of P with PR, located in cytoplasm or nucleus Fig. (1). In absence of ligand PR is associated with heat shock pro-

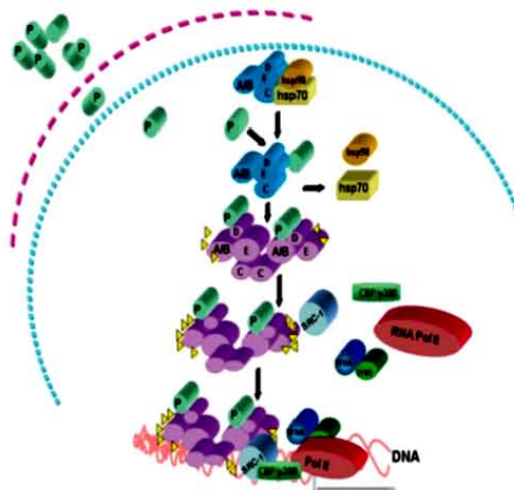


Fig. (1). Genomic action mechanism of P. In the unligated form, PR is associated with chaperone proteins such as heat shock proteins HSP70 and HSP90. After P binding, PR dissociates from chaperone proteins and dimerizes with another PR. Then, PR is phosphorylated (stars) and forms complex with coregulators such as the coactivator SRC-1. PR interacts with PRE in the promoter region of steroid target genes, and the basal transcription machinery is recruited. P, steroid hormone; A/B, C, D and E are steroid receptor domains; PRE progesterone responsive elements.

teins (HSP70 and HSP90). When the hormone interacts with PR it induces conformational changes that allow the dissociation with heat shock proteins, followed by phosphorylation and dimerization of the receptor. The resulting structure possesses high affinity for specific sequences in the DNA.

*Address correspondence to this author at the Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Coyoacán 04510, México D.F. México; Fax: 5255-5616-2010; E-mail: camachoarroyo@gmail.com

known as P response elements (PRE) which are present in the promoter region of P target genes. Once bound to PRE, PR is able to recruit coactivator and corepressor proteins regulating gene transcription [11] P induces PR phosphorylation, which signals it to degradation by the ubiquitin-proteasome system [12-14].

ASTROCYTOMAS

Astrocytomas arise from astrocytes and are the most common primary intracerebral neoplasms in humans. Astrocytic tumors constitute 65-70% of all gliomas, and four malignancy grades are recognised by the World Health Organisation (WHO). Grade I applies to lesions with low proliferative potential, minimal variation in shape and size of nuclei and the possibility of cure following surgical resection. Grade II tumors are generally infiltrative, present low proliferative activity, nuclear atypia and some grade II tumors tend to progress to higher grades of malignancy. The designation grade III tumor is generally reserved for lesions with histological evidence of malignancy, including nuclear atypia and brisk mitotic activity, patients with grade III tumors receive adjuvant radiation and/or chemotherapy. Grade IV tumors exhibit more advanced features of malignancy, including vascular proliferation, mitoses and necrosis, typically associated with rapid pre- and postoperative disease evolution and a fatal outcome [15, 16].

The average survival of patients with an astrocytoma grade II is around 7 years, while patients with astrocytomas grade III have a median survival half that time. Astrocytomas grade IV (glioblastoma) patients have a very poor prognosis with average survival reported between 9 and 11 months. Glioblastomas are divided into those that develop from a previously diagnosed astrocytoma and those that appear to develop *de novo* [17]. The treatment given to patients with astrocytomas depends on many factors, including the tumor size and localization, its growth rate, and the symptoms the patient is experiencing. Various strategies have been used to treat astrocytomas including extensive surgical resection, fractionated and focused radiation and intracavitary and/or intra-arterial chemotherapy. Despite these treatment strategies, median survival has remained only approximately 1 year for decades. Thus, it is urgent to develop more effective therapies for this disease. The ubiquitin-proteasome pathway plays a critical role in the degradation of intracellular proteins involved in cell-cycle control, transcription factor activation, apoptosis, cell trafficking, and tumor growth, including PR [14, 18, 19]. Recently, the ubiquitin-proteasome pathway has emerged as a new target in anticancer therapy. It has been reported that proteasome inhibitors (bortezomib, MG132 or lactacystin) suppresses growth and induces apoptosis in established U251, U87 and D37 glioblastoma multiforme (GBM) cell lines, Rat 9L gliosarcoma cell line as well as in short-term cultures from patient-derived GBM xenografts and in the brain of rat challenged with 9L gliosarcoma [20, 21]. An alternative treatment for astrocytomas is hormonal therapy based on sex steroid hormones such as P, which participates in the regulation of cell proliferation of several tumors, such as, breast cancer and meningiomas [4].

ROLE OF P AND ITS RECEPTOR ON THE GROWTH AND PROLIFERATION IN ASTROCYTOMAS

There are many reports about proliferative and anti-proliferative effects of P in different types of cancer [22]. In brain tumors P has different effects. In cell cultures of meningiomas (intracranial or intraspinal from the arachnoidal layer of meninges) different doses of P (1-100 nM) stimulate cell growth [23], but P inhibits cell growth of prolactinomas [24]. It has been reported that a progestin, medroxyprogesterone (6 μ M), inhibits S-phase of C6 rat glioma cells by 41 and 73% at 48 and 96 h, respectively [23], but RU486 (0.1 and 0.5 mg/day, during 4 days) also inhibits the growth of a human astrocytoma cell line injected in nude mice. The highest dose of RU486 was more effective to reduce the tumor growth as compared with the lower dose (1.8 ± 0.2 and 0.6 ± 0.1 g, respectively) [26]. However, P effects on human astrocytomas growth have not been well characterized. *In vitro*, we have observed that P induces cell proliferation in U373 and D54 cell lines derived from human astrocytomas grade III and IV, respectively [27]. In a time-course study over a 5-day period with different doses of P (1 nM-10 μ M) in U373 and D54 human astrocytoma cell lines we observed that although the majority of P doses induced a slight increase in cell growth of both cell lines, only the dose of 10 nM significantly increased the number of cells from the second day of culture in D54 cells and from the third day in the case of U373 cells [27]. In both cell lines P (10 nM) effect persisted until day 5. It is important to mention that the concentration of P (10 nM) that induces a significant increase in the number of astrocytoma cells is found in the luteal phase of the woman menstrual cycle [28]. The treatment with the PR antagonist, RU486 (10 μ M) without P for 5 days significantly decreased the number of U373 and D54 cells as compared with vehicle treatment from the second day of the experiment. RU486 co-administered with P significantly blocked the effects of the latter on days 2 and 4 in D54 and U373 cells, respectively.

Moreover, P increased (19.8%) S phase of cell cycle in U373 on day 5 and RU486 blocked the effects of P. These data suggest that P effects on human astrocytomas cell lines growth *in vitro*, should be mediated by PR [27]. PR isoforms expression has been detected both in human astrocytomas biopses and in U373 and D54 cell lines.

PR expression assessed by immunohistochemistry directly correlates with histologic grades of human astrocytomas [3]. The percentage of PR expressing in cells high-grade astrocytic tumor biopses was higher than that of low-grade ones, suggesting that PR-positive tumors possess a high proliferative potential. Strong PR nuclear immunopositivity was observed in 59% of glioblastomas (higher malignancy), 45% in anaplastic astrocytomas and 8% in lower grade astrocytomas [29]. On the contrary, meningiomas exhibit an inverse relationship between malignancy and the presence of PR. Thus, malignant meningiomas lack PR, whereas benign ones possess these steroid receptors [30]. Indeed, PR expression in meningiomas is considered to be a favorable prognostic factor [31].

PR isoforms are differentially expressed in human astrocytomas [1]. Our group has observed that PR gene was expressed in 92% of studied astrocytomas biopses (83% and 100% of astrocytomas grades III and IV, respectively). At mRNA level, PR-B expression was higher than that of PR-A in astrocytomas grades III and IV. PR immunostaining was detected in 85% of astrocytomas and, as in the case of RT-PCR studies, PR-B isoform was the predominant one in most tumors (73%) [32].

Recently, we have detected PR isoforms in U373 and D54 human astrocytoma cell lines. In U373 cell line PR-B was the predominant isoform (PR-B:PR-A ratio 3:1) whereas in D54 cells PR-A was the predominant one (PR-B:PR-A ratio 0.66:1) [27]. PR isoforms rate is important because P can exert different functions in a cell, depending on the expression pattern of its isoforms [33]. In PR-A knockout mice (PR-A KO) it has been observed a lower expression of lactoferrin as compared with PR-B KO after treatment with estradiol and P and the contrary effect was observed for calcitonin and histidine carboxylase expression [34]. Thus, this differential PR isoform expression should be involved in the P effects in U373 and D54 cell growth.

It is known that PR isoforms are differentially regulated by estradiol (E) and P in different cells and tissues. In several cell types PR isoforms are up-regulated by E [35, 36]. PR up-regulation by E is mediated by estrogen-responsive elements located in the PR promoter [37] whereas PR down-regulation by its own ligand (P) is associated with ligand-dependent proteolysis; P induces receptor phosphorylation, which signals PR to degradation by the ubiquitin-proteasome pathway [12-14, 38].

In U373 and D54 astrocytomas cell lines we observed that PR isoforms are regulated by E (10 nM) and P (10 nM). In U373 cells PR isoforms content was increased by E, whereas in D54 cells E had no significant effects. In both cell lines P alone did not modify PR isoforms content but this was down-regulated when P was administered after E treatment. PR-A isoform was more sensitive to E + P treatment than PR-B since a greater diminution was observed in PR-A content after the combined treatment. PR down-regulation was blocked with PR antagonist, RU 486, in U373 and D54 cells [39].

PR-A and PR-B exhibit different activities *in vitro*: PR-B is a much stronger activator than PR-A and this one exhibits a dominant negative inhibitory effect on the activity of PR-B [7, 40, 41]. Our group has evaluated the effect of PR-A over-expression on cell growth of U373 cells, which endogenously express a low amount of PR-A. We transfected PR-A to over-express this PR isoform and we observed an increase of 60% in PR-A content in transfected U373 cells. In a time-course study over a 6-day period PR-A over-expression significantly diminished the cell number of U373 cells treated with P (from day 4 to day 6), suggesting that PR-A has an inhibitory effect on cell growth when it is activated by its ligand Fig. (2) [39].

Cancer progression depends on the development of a vascular network that supplies vital nutrients to the growing tumor. Over-expression of certain growth factors and their receptors such as vascular endothelial growth factor (VEGF),

platelet derived growth factor receptor (PDGF), transforming growth factor (TGF) and epidermal growth factor receptor (EGFR) are involved in increased motility, adhesion, invasion and proliferation of tumor cells as well as inhibition of apoptosis and induction of angiogenesis [42-44]. It has been established that natural and synthetic progestins increase VEGF and EGFR expression (mRNA and protein level) in human endothelial, Ishikawa endometrial carcinoma and breast cancer cells (BT-474, T47D and HCC-1428) through a PR-mediated mechanism [45-49].

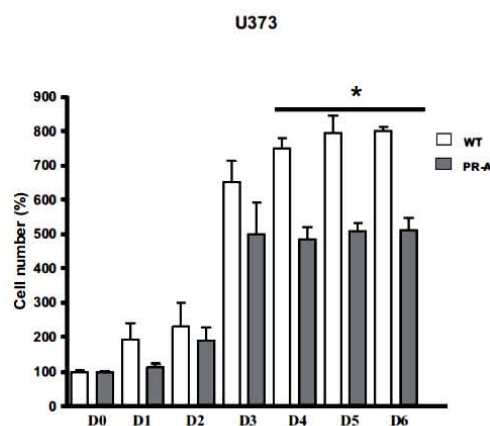


Fig. (2). Effects of PR-A over-expression on U373 cell growth. U373 wild type (WT) and U373 cells were transfected with PR-A. U373 WT cells (white bars) or transfected with PR-A (gray bars) were treated with 10 nM of P during 6 days (D0-D6). Every day cells were removed from incubation and the number of cells was measured by trypan blue dye exclusion. Day zero (D0) value was 100%. Data are expressed as mean \pm S.E.; * $P < 0.05$ vs WT. Modified from Cabrera-Muñoz *et al.* 2009 [39].

It has been demonstrated through immunohistochemistry and Western blot that expression of VEGF and EGFR directly correlates with the tumor grade, the recurrence, and the survival of patients with astrocytomas [50]. Preliminary studies in our laboratory have demonstrated that P up-regulates VEGF and EGFR expression in D54 cells. P (10 nM) increased VEGF and EGFR mRNA expression after 12 h of treatment, as well as EGFR protein content after 24 h. This suggests that P should participate in progression of high-grade astrocytomas tumor evolution by increasing the expression VEGF and EGFR.

CONCLUSION AND PERSPECTIVES

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

Progesterone in Astrocytomas

- oestradiol and progesterone treatments. *J. Neuroendocrinol.*, 2003, 15(10), 984-990.
- [37] Kraus, W. L.; Montano, M. M.; Katzenellenbogen, B. S. Identification of multiple, widely spaced estrogen-responsive regions in the rat progesterone receptor gene. *Mol. Endocrinol.*, 1994, 8(8), 952-969.
- [38] Weigel, N. L. Steroid hormone receptors and their regulation by phosphorylation. *Biochem. J.*, 1996, 319 (Pt 3), 657-667.
- [39] Cabrera-Munoz, E.; Gonzalez-Arenas, A.; Saqui-Salces, M.; Camacho, J.; Larrea, F.; Garcia-Becerra, R.; Camacho-Arroyo, I. Regulation of progesterone receptor isoforms content in human astrocytoma cell lines. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.*, 2009, 113 (1-2), 80-84.
- [40] Giangrande, P. H.; McDonnell, D. P. The A and B isoforms of the human progesterone receptor: two functionally different transcription factors encoded by a single gene. *Recent Prog. Horm. Res.*, 1999, 54, 291-313.
- [41] Hovland, A. R.; Powell, R. L.; Takimoto, G. S.; Tung, L.; Horwitz, K. B. An N-terminal inhibitory function, IF, suppresses transcription by the A-isoform but not the B-isoform of human progesterone receptors. *J. Biol. Chem.*, 1998, 273(10), 5455-5460.
- [42] Nicholas, M. K.; Lukas, R. V.; Jafri, N. F.; Faoro, L.; Salgia, R. Epidermal growth factor receptor - mediated signal transduction in the development and therapy of gliomas. *Clin. Cancer Res.*, 2006, 12(24), 7261-7270.
- [43] Omuro, A. M.; Faivre, S.; Raymond, E. Lessons learned in the development of targeted therapy for malignant gliomas. *Mol. Cancer Ther.*, 2007, 6 (7), 1909-1919.

Current Topics in Medicinal Chemistry, 2011, Vol. 11, No. 13 1667

- [44] Oka, N.; Soeda, A.; Inagaki, A.; Onodera, M.; Maruyama, H.; Hara, A.; Kunisada, T.; Mori, H.; Iwama, T. VEGF promotes tumorigenesis and angiogenesis of human glioblastoma stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2007, 360(3), 553-559.
- [45] Mueller, M. D.; Vigne, J. L.; Pritts, E. A.; Chao, V.; Dreher, E.; Taylor, R. N. Progesterins activate vascular endothelial growth factor gene transcription in endometrial adenocarcinoma cells. *Fertil Steril.*, 2003, 79(2), 386-392.
- [46] Zhao, S.; Chen, X.; Lu, X.; Yu, Y.; Feng, Y. Epidermal growth factor receptor signaling enhanced by long-term medroxyprogesterone acetate treatment in endometrial carcinoma. *Gynecol. Oncol.*, 2007, 105(1), 45-54.
- [47] Liang, Y.; Hyder, S. M. Proliferation of endothelial and tumor epithelial cells by progestin-induced vascular endothelial growth factor from human breast cancer cells: paracrine and autocrine effects. *Endocrinology*, 2005, 146(8), 3632-3641.
- [48] Lockwood, C. J.; Krikun, G.; Runic, R.; Schwartz, L. B.; Mesia, A. F.; Schatz, F. Progestin-epidermal growth factor regulation of tissue factor expression during decidualization of human endometrial stromal cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2000, 85(1), 297-301.
- [49] Faivre, E. J.; Daniel, A. R.; Hillard, C. J.; Lange, C. A. Progesterone receptor rapid signaling mediates serine 345 phosphorylation and tethering to specificity protein 1 transcription factors. *Mol. Endocrinol.*, 2008, 22(4), 823-837.
- [50] Knizetova, P.; Ehrmann, J.; Hlobilkova, A.; Vancova, I.; Kalita, O.; Kolar, Z.; Bartek, J. Autocrine regulation of glioblastoma cell cycle progression, viability and radioresistance through the VEGF-VEGFR2 (KDR) interplay. *Cell Cycle*, 2008, 7 (16), 2553-2561.

Received: March 30, 2010

Accepted: August 18, 2010