



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

**PAPEL DE LA PROGESTERONA Y DE SU RECEPTOR EN LA REGULACIÓN  
DEL PATRÓN DE EXPRESIÓN GÉNICA EN ASTROCITOMAS HUMANOS**

**TESIS**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestra en Ciencias**

**PRESENTA:  
TANIA KARINA GONZÁLEZ GARCÍA**

**TUTOR PRINCIPAL: DR. IGNACIO CAMACHO ARROYO  
FACULTAD DE QUÍMICA**

**COMITÉ TUTOR:  
DRA. MARÍA CRISTINA FERNÁNDEZ MEJÍA  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS  
DRA. MARÍA EUGENIA TORRES MÁRQUEZ  
FACULTAD DE MEDICINA**

**MÉXICO, D. F. marzo, 2014**



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.

## **AGRADECIMIENTOS**

La realización de la presente tesis fue posible gracias al apoyo económico brindado por el Programa UNAM-DGAPA-PAPIIT IN212611 y por CONACYT (proyecto 100645) bajo la dirección del Dr. Ignacio Camacho Arroyo en el Departamento de Biología de la Facultad de Química de la UNAM.

Se agradece a la Dra. Aliesha González Arenas de la Facultad de Química de la UNAM por la supervisión técnica del presente trabajo; al Dr. Mauricio Rodríguez Dorantes del INMEGEN por la asesoría general y al Q.F.B. Iván Salido Guadarrama por la asesoría con los microarreglos.

Agradecimiento también al comité tutor el cual estuvo formado por la Dra. Cristina Fernández Mejía y la Dra. María Eugenia Torres, que asesoró el desarrollo de este trabajo.

## ÍNDICE

|  |    |
|--|----|
| <b>1. Resumen</b> .....  | 1  |
| <b>2. Introducción</b> .....   | 3  |
| <b>3. Antecedentes</b> .....   | 5  |
| 3.1. Cáncer y sus principales características .....                    | 5  |
| 3.2. Astrocitomas .....  | 9  |
| 3.3. Estructura y funciones de la progesterona (P <sub>4</sub> ) ..... | 14 |
| 3.3.1. Antagonistas de la P <sub>4</sub> .....                         | 17 |
| 3.4. Receptor a progesterona (RP) .....                                | 19 |
| 3.4.1. Características y funciones del RP .....                        | 19 |
| 3.4.2. Isoformas del RP .....  | 21 |
| 3.5. Mecanismos de acción de la P <sub>4</sub> .....                   | 23 |
| 3.6. P <sub>4</sub> y cáncer .....                                     | 26 |
| 3.6.1. P <sub>4</sub> y tumores cerebrales .....                       | 27 |
| <b>4. Planteamiento del problema</b> .....                             | 30 |
| <b>5. Hipótesis</b> .....  | 30 |
| <b>6. Objetivos</b> .....  | 31 |
| 6.1. Objetivo general .....  | 31 |
| 6.2. Objetivos particulares .....                                      | 31 |
| <b>7. Metodología</b> .....  | 32 |
| 7.1. Cultivo celular .....   | 32 |
| 7.2. Extracción de RNA total .....                                     | 32 |
| 7.3. Microarreglos .....   | 34 |
| 7.3.1. Análisis de datos .....   | 35 |
| 7.4. RT-PCR .....  | 36 |
| 7.4.1. Oligonucleótidos .....  | 36 |
| 7.4.2. Síntesis de cDNA .....  | 37 |
| 7.4.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) .....                 | 38 |
| 7.4.4. Análisis densitométrico y estadístico .....                     | 38 |
| <b>8. Resultados</b> .....   | 40 |

|   |           |
|---|-----------|
| 8.1. Análisis de expresión mediante microarreglos .....                 | 40        |
| 8.2. Validación de algunos resultados obtenidos por microarreglos ..... | 50        |
| <b>9. Discusión .....</b>   | <b>61</b> |
| <b>10. Conclusiones .....</b>   | <b>69</b> |
| <b>11. Referencias .....</b>  | <b>70</b> |
| <b>12. Anexos .....</b>   | <b>82</b> |
| 12.1. Estandarización de las condiciones para PCR .....                 | 82        |
| 12.2. Lista de genes diferencialmente expresados .....                  | 84        |

## 1. RESUMEN

La progesterona ( $P_4$ ) es una hormona esteroide sintetizada y secretada principalmente en el ovario mientras que sus órganos blanco son el útero, la glándula mamaria y el cerebro. Es fundamental en la regulación de la reproducción, sin embargo, también puede participar en diversos procesos no reproductivos y patológicos como el cáncer. Muchos de sus efectos están mediados a través de la unión con su receptor intracelular, el receptor a progesterona (RP), aunque también existen otros mecanismos como aquéllos que involucran receptores membranales y/o moléculas a nivel del citoplasma. Se sabe que la  $P_4$  puede participar en la regulación del desarrollo y/o crecimiento tumoral en sus órganos blanco y que puede ocurrir a través de la regulación de la expresión de genes. Este es el caso del cerebro, donde se ha propuesto que puede regular el desarrollo y crecimiento de los astrocitomas, que son los tumores cerebrales más frecuentes y más agresivos en el ser humano. Éstos, como muchos otros tipos de cáncer, presentan un gran número de genes que tienen alterada su expresión y que están involucrados en diversos procesos como proliferación, angiogénesis, muerte celular, metabolismo, etc, sin embargo, sólo se conoce el papel de la  $P_4$  y del RP sobre la expresión de muy pocos de éstos en astrocitomas humanos.

Es por lo anterior que en el presente trabajo se determinó el efecto de la  $P_4$ , además del RU486 para determinar el posible papel del RP en el mecanismo de acción, en el perfil de expresión génica en la línea celular U373 derivada de astrocitomas humanos de grado III (de IV posibles) de evolución tumoral, es decir, de alto grado de malignidad, por medio de microarreglos y confirmación de resultados con la técnica de RT-PCR. Mediante microarreglos se encontró que a las 12 h los distintos tratamientos ( $P_4$ ; RU486, antagonista del RP; y  $P_4$ +RU486) alteran la expresión de diversos genes. En algunos casos el efecto de la  $P_4$  es revertido por el tratamiento con RU486 lo que indica que la  $P_4$  actúa a través del RP y sugiere un mecanismo de acción clásico. Para el proceso de validación se eligió al gen de la proteína relacionada a la patogénesis por glioma 2 (GLIPR2),

del receptor a interleucina 7 (IL7R), del factor de transcripción de unión a elementos regulados por esteroles 1 (SREBF-1), de interleucina 18 (IL18), del factor de crecimiento transformante  $\beta$ -2 (TGF $\beta$ 2), de la proteína asociada a microtúbulos 1B (MAP1B), de anilina, proteína de unión a actina (ANLN), de gamma A hemoglobina (HBG1), de la proteína 4 que contiene el dominio de transferencia de lípidos relacionada a STAR (STARD4) y de la proteína 1 de adhesión vascular (AOC3); y fueron seleccionados ya sea por su posible importancia biológica, en especial en los procesos tumorales, el tratamiento con el que presentó cambio en los microarreglos y/o porque el valor de la tasa de cambio fue alto. A través de la validación por RT-PCR de las alteraciones observadas por la técnica de microarreglos, se confirmaron los cambios en la expresión de ciertos genes como GLIPR2 lo que los hace de primera elección para continuar con su estudio ya que su cambio en la expresión es invariable, mientras que para otros como TGF $\beta$ 2 e IL18 la correlación entre los cambios en los niveles de mRNA detectados por las técnicas utilizadas fue parcial o nula, por lo que al profundizar su estudio hay que considerar esos cambios con más reserva y cuidado. De forma independiente de la correlación, los resultados muestran que aparte del RP intracelular, hay una participación importante de otros mecanismos de acción, como pudiera ser a través del RP de membrana, y sugieren nuevos e importantes genes blanco de la P<sub>4</sub> en astrocitomas humanos, cuyos productos pueden participar en los efectos de la hormona en dichos tumores y que podrían ser objeto de más estudios para entender mejor esta patología.

## 2. INTRODUCCIÓN

Los tumores del sistema nervioso central (SNC) constituyen una causa frecuente de muerte en la población mundial adulta y se presentan 18.71 casos por 100,000 habitantes por año. Dentro de éstos, los tumores derivados de células gliales son los más comunes, representan el 32% de total y 80% de los tumores malignos del CNS en Estados Unidos. Los astrocitomas representan aproximadamente el 76% de los tumores gliales e incluyen al astrocitoma anaplásico y el glioblastoma multiforme (grados III y IV), que son las variantes más malignas y frecuentes de los tumores astrocíticos (30 y 50% de frecuencia respectivamente) según estadísticas de los Estados Unidos (Pérez *et al.*, 2001; Agnihotri *et al.*, 2013). A nivel poblacional, la frecuencia de padecimiento de un astrocitoma es mayor en hombres que en mujeres (3:2), proporción que sugiere participación hormonal y que se observa principalmente en los astrocitomas de mayor grado de evolución (Schwartzbaum *et al.*, 2006; Ohgaki y Kleihues, 2007). En México los datos epidemiológicos acerca de los tumores cerebrales son muy escasos e incompletos. Sólo uno de ellos, realizado en 2001, reporta que en 1998 la tasa de mortalidad por tumores del encéfalo (dentro de los que principalmente se encuentran los astrocitomas) fue de 230,000 con 121,800 defunciones y que en el mismo año se registraron 117,200 casos nuevos. En este mismo trabajo se menciona que, de 216 casos tratados en el Instituto Nacional de Cancerología y Nacional de Neurología y Neurocirugía entre 1985 y 1994, el 60% correspondió al género masculino (Souto del Bosque *et al.*, 2001). 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 puede ir de menos de 1 año (desde aprox. 5 meses) hasta máximo 3. 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 crecimiento y evolución en el grado de malignidad de los astrocitomas (Sarkar *et al.*, 2009).



Existen informes que muestran que las hormonas sexuales, entre las que se encuentra la progesterona ( $P_4$ ), pueden participar en el crecimiento de los tumores cerebrales (Camacho-Arroyo *et al.*, 2000; González-Agüero *et al.*, 2007; González-Agüero *et al.*, 2001). Además, existe evidencia que indica que la  $P_4$  es capaz de regular la expresión de ciertos genes que comúnmente se encuentran implicados en diversos tipos de cáncer (Purmonen *et al.*, 2008; Kim y Chapman-Davis, 2010; Hernández-Hernández *et al.*, 2012).

A pesar de las investigaciones sobre hormonas y su relación con el desarrollo y crecimiento de tumores, se desconoce el papel de la  $P_4$  en la regulación del perfil de expresión génica en astrocitomas, por lo que en este trabajo se estudió el efecto de la  $P_4$  sobre tal expresión en la línea celular de astrocitomas humanos U373 de grado III de evolución tumoral.

### 3. ANTECEDENTES

#### 3.1. Cáncer y sus principales características

Cáncer es un término que se refiere a enfermedades en las que células anormales se dividen de forma incontrolada y pueden invadir otros tejidos. Ese tipo de células puede diseminarse a otras partes del cuerpo por el sistema sanguíneo y por el sistema linfático (NCI, 2012; World Health Organization, 2002).

Los términos cáncer y tumor son en ocasiones utilizados indistintamente, sin embargo, un tumor no es necesariamente cáncer, ya que se refiere sólo a un crecimiento anormal de las células de forma que éstas se dividen más rápidamente que la células sanas del mismo tipo, lo cual se conoce también como tumor benigno (Stricker y Kumar, 2009; Strayer y Rubin, 2012).

De forma general, el cáncer puede dividirse en categorías, que incluyen:

- Carcinoma: cáncer que empieza en la piel o tejidos que delimitan o cubren órganos internos.
- Sarcoma: cáncer que comienza en hueso, cartílago, tejido graso, músculo, vasos sanguíneos u otro tejido conectivo o de soporte.
- Leucemia: cáncer que inicia en la médula ósea y afecta a las células sanguíneas y sus precursores.
- Linfoma y mieloma: cáncer que comienza en células del sistema inmune
- Cáncer/tumor del sistema nervioso central (SNC): cáncer que empieza en tejido cerebral y médula espinal (Dollinger *et al.*, 2008; NCI, 2012).

Las células en el cáncer contienen todos los elementos necesarios para su sobrevivencia y poder llevar a cabo proliferación, diferenciación, muerte celular y funciones célula-específicas, sin embargo, la regulación de estas funciones se encuentra alterada (Chow, 2010).

En esta patología, numerosas funciones celulares tienden a ser inapropiadamente reguladas de forma que se observan cambios importantes. Entre estos se encuentra una proliferación celular anormal, es decir, en este caso

un incremento en el número de células con respecto al tejido sano como resultado de un mayor crecimiento y división celular.

De forma general, la velocidad de proliferación en cualquier población de células depende de tres parámetros: 1) la velocidad de división celular, 2) la fracción de células dentro de esa población que llevan a cabo división celular y 3) la velocidad de pérdida de células de la población debida a que llegan a su diferenciación terminal o debida a muerte celular (Alenzi, 2004).

Para mantener la homeostasis y presentar un desarrollo normal, cada tejido mantiene una fuerte regulación y dispone de diversos mecanismos de control sobre cada uno de los parámetros implicados en la velocidad de proliferación celular. Entre los mecanismos más importantes implicados en este proceso se encuentran la capacidad de respuesta a factores inductores e inhibidores de crecimiento y la capacidad limitada para replicarse. En contraste con células sanas, se sabe que en las células tumorales se pierden gradualmente estos mecanismos (Witsch *et al.*, 2010; Oriola *et al.* 2004). Muchas de las causas de estas pérdidas son debidas a alteraciones en los genes que dan lugar a cambios relacionados directamente con las proteínas (ya sea que resulte modificada su estructura o su expresión), gran cantidad de las cuales son capaces de aumentar de forma directa o indirecta la proliferación celular. Entre éstos se pueden encontrar proto-oncogenes y/o genes supresores de tumores (Duffy *et al.* 2008).

En células tumorales se han observado defectos a diferentes niveles. Por ejemplo, estas células pueden ser capaces de producir sus propios factores de crecimiento. Alternativamente, hay receptores que pueden ser producidos en exceso, como es el caso del receptor al factor de crecimiento epidérmico (EGFR) en numerosos tumores, de forma que, a cierta concentración de ligando hay una mayor estimulación que la observada en células sanas. También hay alteraciones que pueden modificar mecanismos de señalización intracelular (Witsch *et al.*, 2010).

También se sabe que los procesos fisiológicos de muerte celular, particularmente muerte celular programada o apoptosis, resultan desregulados en las células de cáncer (Hanahan y Weinberg, 2011; Oriola *et al.* 2004).

Se conocen tres vías de apoptosis, las cuales resultan en la activación de caspasas efectoras (3, 6 y 7), cisteína proteasas que cortan sus sustratos en el enlace que se encuentra inmediatamente después de residuos específicos de ácido aspártico. Una de las vías es la mitocondrial o vía del citocromo C, la cual es mediada a través de miembros de la familia Bcl-2, lo cual resulta en la activación de Apaf-1, caspasa-9 y caspasa-3. La segunda vía involucra a miembros de la familia de receptores a TNF (por ejemplo, receptores Fas o TRAIL) y activación de la caspasa-8 para subsecuentemente activar a la caspasa-3. Finalmente, la granzima B (producto citolítico de las células T) directamente corta a la caspasa 3 y/o activa una serie de caspasas lo cual resulta en apoptosis (Elmore, 2007; Tait y Green, 2010).

La muerte celular es un mecanismo necesario y complementario a la proliferación para asegurar la homeostasis de todos los tejidos y necesita ser altamente regulado ya que defectos en la maquinaria apoptótica aumentan la sobrevivencia celular y pueden contribuir a la expansión neoplásica. Además, alteraciones en las vías apoptóticas confieren resistencia a quimioterapia, radiación y destrucción celular mediada por la respuesta inmune (Elmore, 2007).

La diferenciación celular es otro de los procesos que pueden estar alterados en el cáncer; puede ser detenida en una etapa particular o bien, las células tumorales pueden diferenciarse a un tipo celular inapropiado o anormal. La organización cromosómica y genética puede ser desestabilizada de tal forma que se originan con alta frecuencia variantes celulares; algunas de estas pueden presentar incremento o disminución en la producción de proteínas, entre ellas, las que permiten invasión celular y metástasis (Hanahan y Weinberg, 2011).

La invasión es un proceso más eficiente que la metástasis, ya que se sabe que diariamente millones de células pasan a la circulación, pero solamente una pequeña fracción logra colonizar otros tejidos y es considerado como prerrequisito para la metástasis (Wittekind y Neid, 2005).

La metástasis es un proceso en el cual una célula o un grupo de ellas son capaces de dejar el tumor primario para colonizar y crecer en un sitio o tejido secundario. Involucra una serie de momentos que incluyen, escape de las células

del sitio primario del tumor, infiltración al estroma local, entrada a los vasos sanguíneos y linfáticos (intravasación), agregación con las plaquetas, interacción con adhesión al endotelio distante, extravasación y evasión del sistema inmune, todo para llegar a la recolonización y expansión celular (Thomson y Newgreen, 2005; Paz *et al.*, 2013).

La invasión y metástasis son las características más peligrosas del cáncer (Nguyen *et al.*, 2009; Paz *et al.*, 2013). La capacidad de invasión puede no ser expresada inicialmente o en todos los tumores, de aquí que sea posible realizar resección del tejido tumoral, sin embargo, en muchos de los casos se da un posterior desarrollo del potencial invasivo de forma que el tumor se vuelve maligno y se desarrolla cáncer. Una vez que el tumor se vuelve invasivo, puede diseminarse a través de canales linfáticos y/o vasculares. La invasión local puede comprometer la función de los tejidos involucrados por compresión y destrucción de estos o mediante la prevención de su funcionamiento normal, sin embargo, el cambio determinante en este tipo de patologías es el establecimiento de metástasis. En esta última etapa el cáncer no puede ser tratado con terapia local como única forma de tratamiento.

Tumores de tamaño e histología similares pueden presentar un potencial metastásico diferente ya que éste depende, además del genotipo, de factores locales externos (Nguyen *et al.*, 2009).

Finalmente, hay que considerar que en el cáncer, al igual que en las células sanas, para que un tumor pueda desarrollarse, sus células requieren oxígeno, nutrientes, hormonas y factores de crecimiento (para lo cual, a través de la angiogénesis y linfangiogénesis, se forman nuevos capilares que proveen conductos), sin embargo, ya que la proliferación en éstas es mayor, el suministro, producción, respuesta y señalización de estos elementos también se encuentra alterado para permitir que se lleven a cabo los procesos relacionados con su mantenimiento o progresión, por ejemplo, la expansión clonal o invasión (Witsch *et al.*, 2010).

### 3.2. Astrocitomas

Los astrocitomas son tumores neuroectodérmicos (Louis, 2006) que surgen de los astrocitos, los cuales son un tipo de células gliales, por lo que, un astrocitoma es un tipo de glioma (Badash, 2009). Este tipo de tumores son las neoplasias cerebrales primarias más comunes y agresivas en seres humanos, se presentan principalmente en adultos de entre 50 y 70 años y poseen un alto potencial de malignidad (González-Agüero *et al.*, 2001).

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) y capacidad de invasión y progresión, en cuatro grados de malignidad, siendo los de grado I biológicamente menos agresivos y los de grado IV aquéllos de mayor agresividad:

- *Astrocitoma pilocítico (grado I)*

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.*, 2009). Estos tumores usualmente pueden ser eliminados mediante resección quirúrgica (total o parcial) y/o radio/quimioterapia (Bristol, 2009).

- *Astrocitoma difuso (grado II)*

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, 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, un marcador de astrocitos y células madre neurales, 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.*, 2009). El tratamiento puede incluir resección quirúrgica (aunque en mucho menor medida que en los astrocitomas grado I debido a su capacidad de infiltración), quimioterapia y/o radioterapia (Bristol, 2009). En general, la media de sobrevivencia de los pacientes es de 5 años (Louis *et al.*, 2007).

- *Astrocitoma anaplásico (grado III)*

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. (Sarkar *et al.*, 2009) Los astrocitomas anaplásicos son el grado de astrocitoma con diagnóstico más frecuente y comúnmente progresan a tumores grado IV en un tiempo de máximo 8 años, sin embargo, no existe un marcador que pueda predecir el tiempo de progresión de forma individual (Schittenhelm, 2011). 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).

- *Glioblastoma multiforme (grado IV)*

El glioblastoma multiforme 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 y expresión de marcadores característicos como GFAP y S-100, mientras que otras de las células presentes están desdiferenciadas y 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 y Van Meir, 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. Morfológicamente, los glioblastomas primarios y secundarios son indistinguibles entre ellos, sin embargo, diversos estudios han mostrado que estos subtipos presentan recurrentes alteraciones en el número de copias del DNA y diferentes patrones transcripcionales que finalmente resultan en la alteración de vías similares de señalización. 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 (Furnari *et al.*, 2007 y Sarkar *et al.*, 2009). La sobrevivencia de los pacientes con glioblastoma multiforme 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 y Van Meir, 2009).

Incluso con todos los avances terapéuticos, la intervención curativa 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 y Longo, 2005 y Stupp *et al.*, 2010).

Las causas por las que se desarrollan los astrocitomas aún no están bien establecidas, sin embargo, se ha determinado que, como en muchos otros tipos de cáncer, diversos factores genéticos y ambientales podrían estar implicados en su etiología a diferentes niveles. Se ha propuesto también que otros factores pueden regular el crecimiento tumoral, entre ellos, las hormonas sexuales como la progesterona, P<sub>4</sub> (Anand *et al.*, 2008, Park *et al.*, 2008; Silvera *et al.*, 2006).

A pesar de los tratamientos actuales, aún con los más agresivos, que incluyen cirugía, radioterapia y quimioterapia, e incluso con todos los avances terapéuticos, el pronóstico y la intervención curativa 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, inmunoterapia, terapia génica y tratamientos endócrinos (Edward y Longo, 2005; Batchelor y Supko, 2013).

En general, los primeros síntomas causados por 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 supervivencia de los pacientes está inversamente relacionada al grado del tumor (Daumas-Duport *et al.*, 1988).

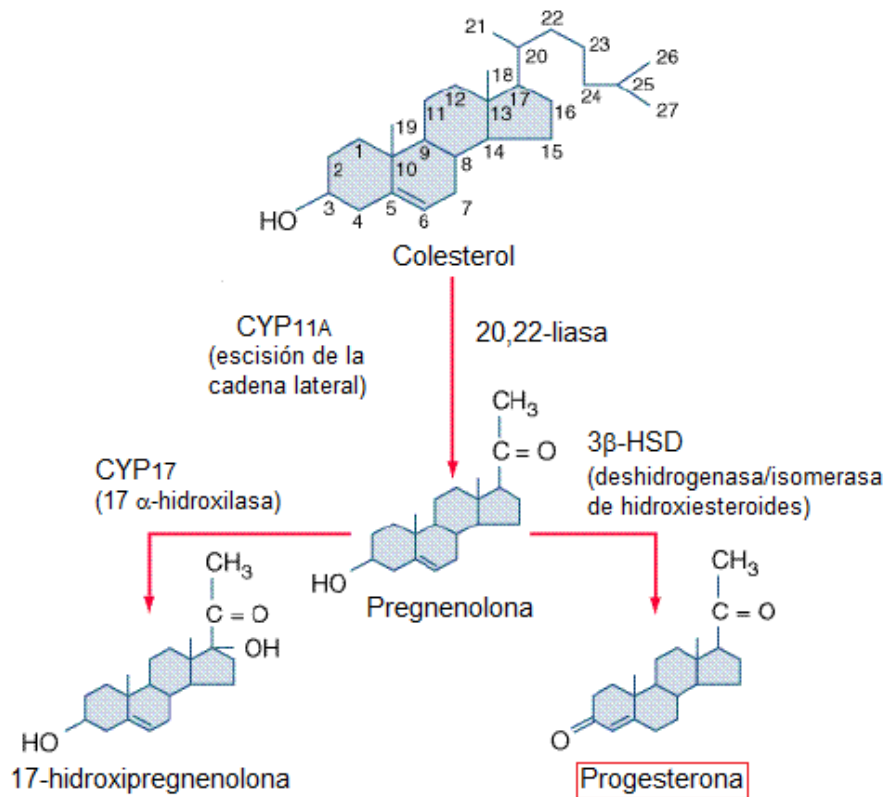
Las alteraciones más frecuentes que se encuentran en astrocitomas son la pérdida de heterocigocidad, la desregulación de las vías de señalización de p53/ubiquitina ligasa de p53 (MDM2)/inhibidor de la cinasa 2B dependiente de ciclina (P14arf) y de cinasa 4 dependiente de ciclina (CDK4)/gen del retinoblastoma (RB)/inhibidor de la cinasa 2A dependiente de ciclina (P16ink4) implicadas en división celular, así como la anormalidad en la expresión de genes como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), que promueve la angiogénesis, el receptor al factor de crecimiento epidérmico (EGFR), que promueve la división celular y la ciclina D1 que participa en la regulación del ciclo celular (Ichimura *et al.*, 2004). Se han reportado altos niveles del mRNA y de la proteína de VEGF, EGFR y ciclina D1 en biopsias de tumores obtenidas de pacientes con astrocitomas grado IV comparado con los de grado II y III asociados con alta proliferación celular y una menor supervivencia de los pacientes (Godard *et al.*, 2003; Sallinen *et al.*, 1999).

Las causas por las que se desarrollan los astrocitomas aún no están bien establecidas, sin embargo, se ha observado que, como en muchos otros tipos de cáncer, diversos factores genéticos y ambientales podrían estar implicados en su etiología a diferentes niveles y considerarse como “de riesgo” (Anand *et al.*, 2008; Park *et al.*, 2008). En cuanto a estos factores, existen reportes en donde se menciona que pacientes con ciertas condiciones genéticas raras, como neurofibromatosis (Cheuk *et al.*, 2013), síndrome de Li-Fraumeni (Malkin *et al.*, 1990; Yamada *et al.*, 2009) y síndrome de Turcot (Okamoto *et al.*, 2004), tienen mayor riesgo de desarrollar este tipo de tumores en comparación con los que no las presentan (Cancer Council Australia, 2011). También, entre los factores de riesgo, se ha sugerido la exposición a pesticidas y a radiación no ionizante (Porter, 2012 y Cancer Council Australia, 2011). Además, entre los factores más aceptados, se encuentra la edad y la exposición a radiación ionizante y las hormonas sexuales como la P<sub>4</sub>, las cuales se han propuesto que podrían regular

el crecimiento y desarrollo tumoral (Cancer Council Australia, 2011; Silvera *et al.*, 2006).

### 3.3. Estructura y funciones de la progesterona (P<sub>4</sub>)

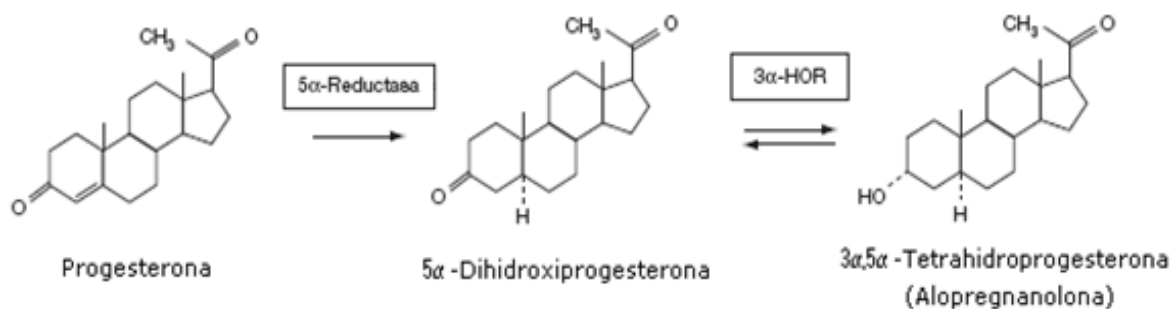
La P<sub>4</sub> (4-pregnen-3,20-diona) es una hormona esteroide de 21 átomos de carbono derivada del colesterol; por lo que al igual que éste, contiene un núcleo de ciclopentanoperhidrofenantreno (Gupta y Chia, 2007; Baeck *et al.*, 2009). El primer paso en su biosíntesis corresponde a la conversión 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<sub>4</sub> (Figura 1) (Schumacher y Guennoun, 2009).



**Figura 1.** Biosíntesis de la P<sub>4</sub>. Conversión de colesterol a pregnenolona por CYP11A (también llamada colesterol 20,22-desmolasa o P450sc) y de ésta a P<sub>4</sub> por la enzima 3β-hidroxisteroide deshidrogenasa (3β-HSD). La 3β-HSD cataliza dos 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).

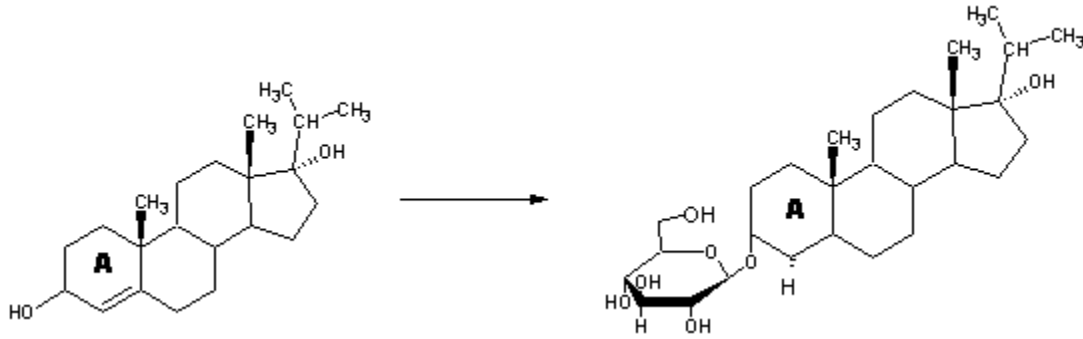
La  $P_4$  es sintetizada y secretada por los ovarios (cuerpo lúteo y folículos), testículos, glándulas adrenales y placenta (Henley *et al.*, 2005). Además, puede ser sintetizada en el cerebro y la médula espinal, ya sea *de novo* a partir del colesterol o a partir de la pregnenolona circulante (Baulieu, 1999). En los vertebrados, la síntesis y secreción de  $P_4$  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  $P_4$  es convertida a  $5\alpha$ -dihidroprogesterona ( $5\alpha$ -DHP), metabolito que es susceptible a una reducción y es convertido a  $3\alpha,5\alpha$ -tetrahidroprogesterona ( $3\alpha,5\alpha$ -THP) (Figura 2). Además, puede ser convertida a  $20\alpha$ -hidroxiprogesterona, un metabolito con menor actividad biológica (Schumacher y Guennoun, 2009).



**Figura 2.** Metabolismo de la  $P_4$ . La enzima  $5\alpha$ -reductasa cataliza la conversión de  $P_4$  a  $5\alpha$ -dihidroprogesterona ( $5\alpha$ -DHP), mientras que la  $3\alpha$ -hidroxiesteroide oxidorreductasa ( $3\alpha$ -HOR; también llamada  $3\alpha$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa) cataliza la conversión de  $5\alpha$ -DHP a  $3\alpha,5\alpha$ -THP (alopregnanolona) (Schumacher y Guennoun, 2009).

Cerca del 2% de la  $P_4$  circulante está en su forma libre o unida a la globulina de unión a hormonas sexuales, mientras que 80% está unida a la albúmina y 18% a la globulina de unión a corticosteroides (transcortina) (Speroff y Fritz, 2005; Westphal *et al.*, 1973). La  $P_4$  tiene una vida media de 36.5 h (Miller *et al.*, 1999) y en el hígado se convierte en pregnandiol, el cual se conjuga con ácido glucurónico y se excreta principalmente en la orina (Figura 3) (Speroff y Fritz, 2005; Gupta y Chia, 2007).



**Figura 3.** Formación de un glucurónido a partir de pregnandiol.

En los varones, la concentración plasmática de  $P_4$  es cercana a 0.3 ng/mL. En las mujeres, la concentración de  $P_4$  es mayor y varía a lo largo del ciclo menstrual (Tabla 1), en el embarazo y en la menopausia (Ángel y Ángel, 2006).

**Tabla 1.** Concentración plasmática de  $P_4$  en las diferentes etapas del ciclo menstrual (Kratz *et al.*, 2010; Angel y Angel, 2006).

| Etapa        | Progesterona (ng/mL) |
|--------------|----------------------|
| Menstruación | 0.1-0.5              |
| Folicular    | 0.1-1.5              |
| Ovulatoria   | 1.5-2.0              |
| Lútea        | 2.5-28.2             |

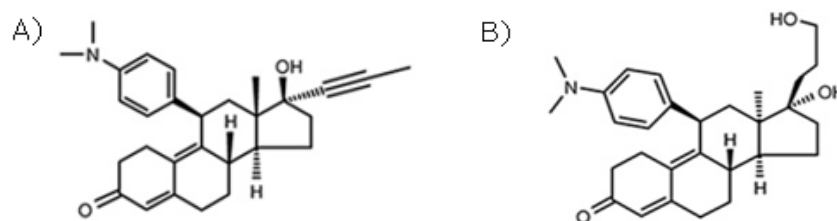
La  $P_4$  se encuentra involucrada en la regulación de un amplio número de funciones en los mamíferos a través de mecanismos de acción que serán explicados más adelante. Participa en procesos como la regulación de la ovulación, estimulación de la regeneración del estroma endometrial, mantenimiento del 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 (Stachenfeld *et al.*, 2000), 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, neuroprotección y en el crecimiento de diversos tumores (Camacho-Arroyo *et al.*, 2003).

En cuanto a los efectos que tiene esta hormona sobre las células del sistema nervioso central, es importante mencionar que no están limitados a las neuronas. De hecho, han sido estudiados sobre los astrocitos *in vitro* e *in vivo* en condiciones de inflamación y/o daño cerebral (como en traumas, patologías hipóxico-isquémicas y daño a la médula espinal), y se ha reportado que la P<sub>4</sub> disminuye su acumulación alrededor de la lesión, inhibe la activación y proliferación de estas células, probablemente a través de un incremento en la apoptosis y una disminución de citocinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$ , y además, que regula a la baja la expresión de GFAP en los astrocitos reactivos, hechos que se ha sugerido que forman parte del proceso de neuroprotección que se le atribuye (Wang *et al.*, 2011; Labombarda *et al.*, 2011; Stein *et al.*, 2008).

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

Los antagonistas de P<sub>4</sub> pertenecen a la gran familia de ligandos del receptor intracelular a esta hormona esteroide (receptor a progesterona, RP). Desde que fue publicado el primer reporte acerca de la mifepristona (RU486), un antagonista de progestinas y glucocorticoides (Figura 4), numerosos ligandos relacionados a éste han sido sintetizados, los cuales exhiben un amplio espectro en su rango de actividad, desde antagonistas de P<sub>4</sub> puros hasta ligandos con actividad de agonista-antagonista (Spitz, 2003).

Inicialmente los antagonistas de P<sub>4</sub> 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 4). 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 4.** Estructura química de dos antagonistas de  $P_4$ . A) RU486 (Mifepristona). La estructura muestra sustituciones en las posiciones 11 y 17 que son características de antiprogestinas esteroidales. B) ZK98299 (Onapristona) (Leonhardt y Edwards, 2002; Raaijmakers *et al.*, 2009).

Se sabe que el RU486 compite con la  $P_4$  por el sitio de unión a ésta en el RP y que se une a éste con una constante de afinidad ( $K_i$ ) media de  $1.4 \text{ nM} \pm 0.3 \text{ nM}$  (ligeramente mayor que la de la  $P_4$ ) (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 donde se une el 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 y Edwards, 2002). Esta conformación alterna no permite la interacción con coactivadores y promueve el reclutamiento de correpresores.

En cuanto a su aplicación clínica, los antagonistas de  $P_4$  tienen diversos efectos sobre el sistema reproductivo de manera que no permiten que la  $P_4$  ejerza sus efectos, ya que tanto las acciones de estos compuestos, así como de la hormona, están mediados a través del RP. Además pueden ser utilizados en el tratamiento de algunos tipos de cáncer. Esto debido a que existen tumores, ya sea benignos o malignos, que poseen receptores para hormonas esteroides o son dependientes de éstas, por ejemplo, el RU486 ha sido utilizado en el tratamiento contra meningiomas y cáncer ovárico, y ya que estos tumores poseen RP, es posible entonces que la mifepristona se una al receptor para inhibir su actividad (Spitz, 2003).

### 3.4. Receptor a progesterona (RP)

#### 3.4.1. Características y funciones del RP

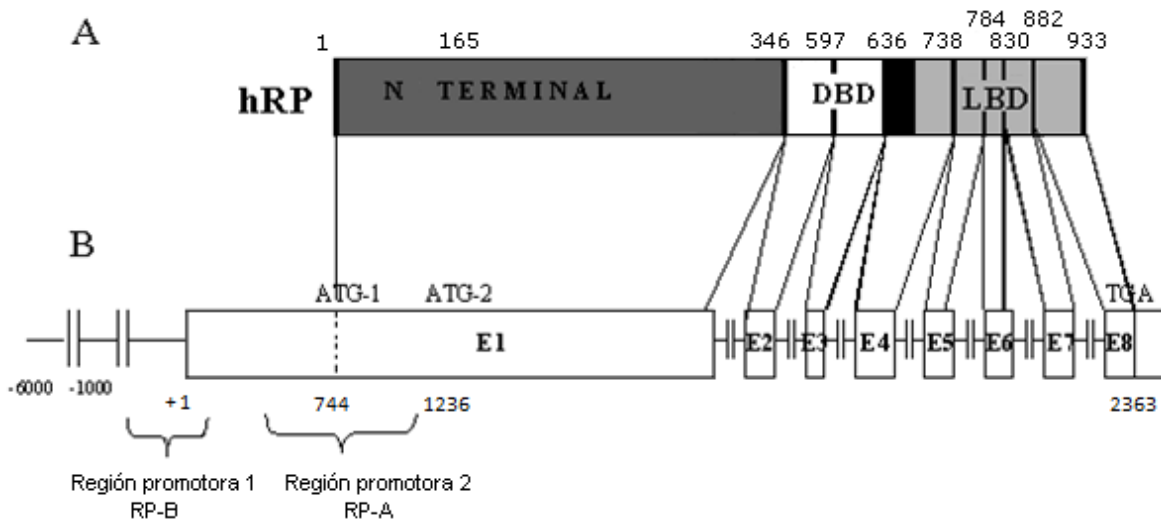
Muchos de los efectos biológicos de la  $P_4$  están mediados a través del RP, el cual pertenece a la superfamilia de receptores nucleares cuyos miembros regulan la expresión de genes en respuesta a la unión con su ligando (Kastner *et al.*, 1990). En una gran variedad de vertebrados, incluyendo aves, roedores, monos y humanos, el RP presenta dos isoformas: una larga denominada RP-B y una corta denominada RP-A (Guerra-Araiza y Camacho-Arroyo, 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 (aa) (Misrahi *et al.*, 1993) (Figura 5).

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 5 y 6).

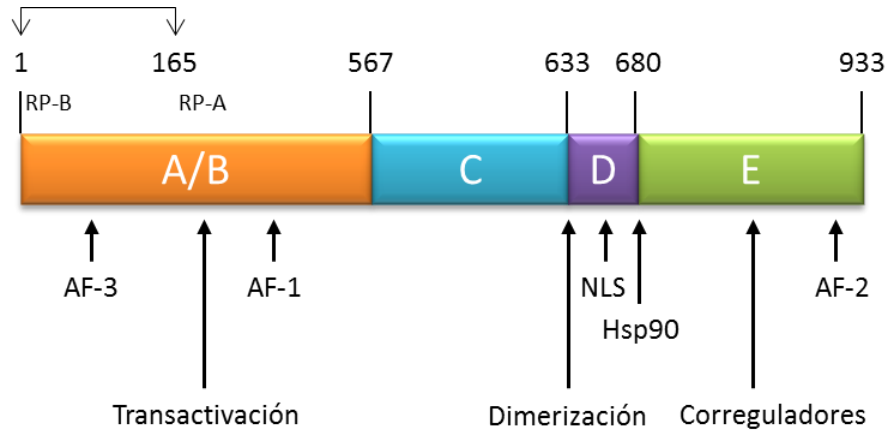
El dominio N-terminal es codificado por el exón 1 y modula las interacciones intramoleculares y proteína-proteína. El DBD se codifica por los exones 2 y 3, consiste de dos motivos denominados “dedos de zinc”, elementos críticos para la activación de genes blanco, participa en su dimerización con otro RP y media la unión del complejo ligando-receptor a elementos de respuesta a progesterona (ERP). Estos últimos consisten, de manera general, 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). El LBD consiste de 10-12  $\alpha$ -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).



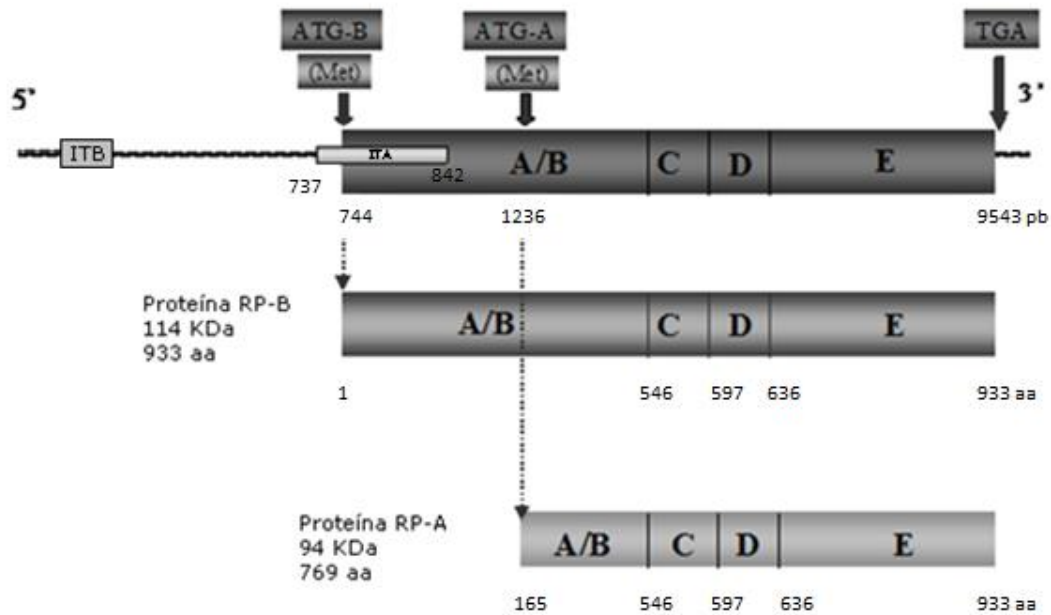
**Figura 5.** Representación esquemática de la estructura de la proteína y del gen del RP humano (hRP). A) Organización de los dominios del RP. La secuencia total de aminoácidos (aa) (933) se muestra dividida en cuatro dominios: en color gris oscuro el dominio amino terminal (N terminal), en blanco el 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 aa, 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).



**Figura 6.** Esquema representativo de los dominios funcionales del RP (A-E). Los números indican las posiciones de los aa 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 y Rodríguez-Dorantes, 2006).

### 3.4.2. Isoformas del RP

Como se mencionó anteriormente, se han identificado dos isoformas del RP, las cuales se han denominado 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 aa en la región amino terminal, mientras que en RP-B sí están presentes (Figura 7). 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 6). Además, existe la presencia de una región con función inhibidora localizada en la región adyacente a AF-1 que sólo es funcional en RP-A (Guerra-Araiza y Camacho-Arroyo, 2000). Estudios cinéticos indican que la constante de disociación de la P<sub>4</sub> por RP-A y RP-B es de 1.2 nM y 0.9 nM, respectivamente (Raaijmakers *et al.*, 2009).



**Figura 7.** 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 (Park-Sarge y Mayo, 1994; Kraus *et al.*, 1993).

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) y corresponde a la secuencia promotora de RP-B, mientras que la otra es proximal (de +464 a +1105) (Figura 5) y corresponde a la secuencia promotora de RP-A (Pathiraja *et al.*, 2011; 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 el efecto de la transcripción mediada por el RP no es igual cuando se forman homodímeros o heterodímeros, hecho que está determinado por la concentración celular de la isoforma específica (Suárez-Calderón y Díaz Yamal, 2008; Horwitz *et al.*, 2007).

Las isoformas del RP pueden tener diferentes funciones dependiendo del tipo de célula, del gen blanco y del promotor (Hansberg-Pastor *et al.*, 2013; Daniel *et al.*, 2009; Camacho-Arroyo y Rodríguez-Dorantes, 2006). En muchos sistemas

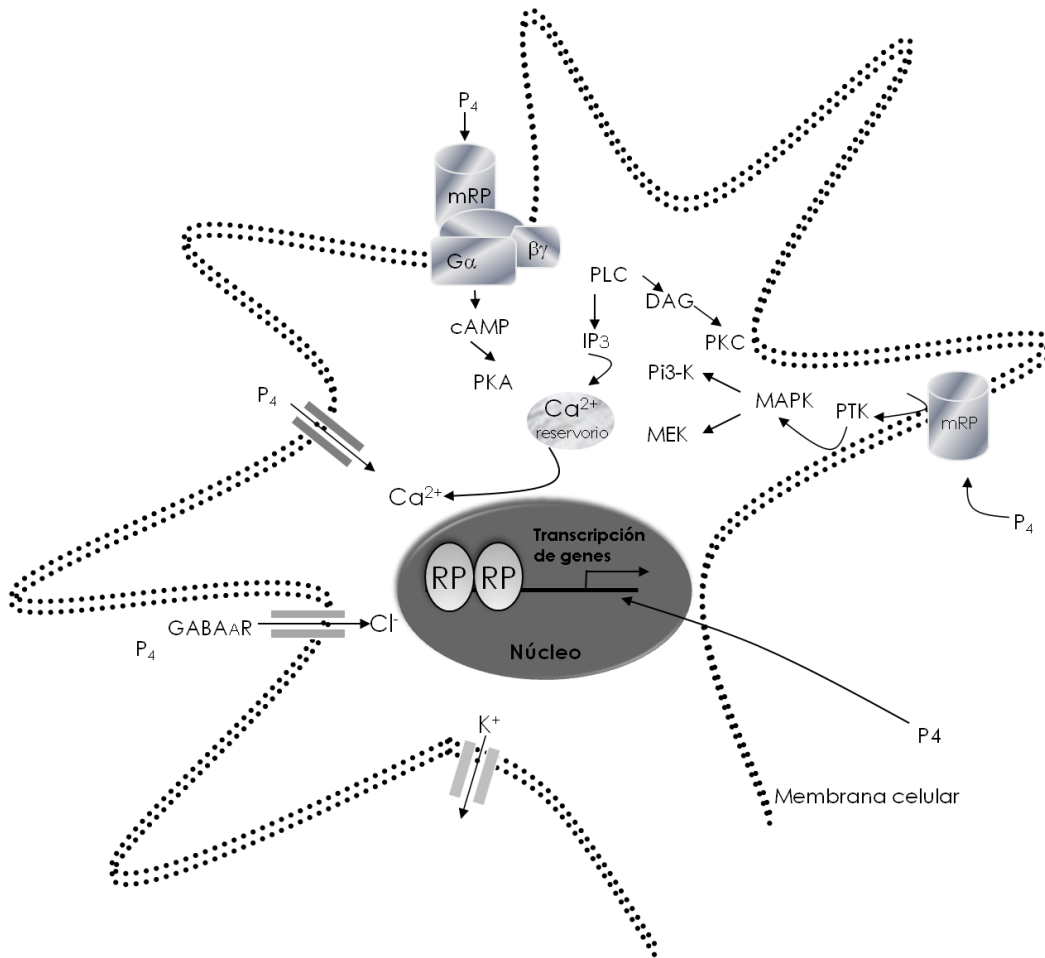
celulares la isoforma RP-B (B:B) actúa como un activador transcripcional, mientras que el RP-A (A:A) funciona como un fuerte represor de la actividad transcripcional, incluyendo a RP-B y otros receptores a hormonas esteroides (Clemm *et al.*, 1995; Mulac-Jericevic y Conneely, 2004; Camacho-Arroyo y Morales, 2012). Esta capacidad represora permite al RP-A mediar las acciones de la  $P_4$  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 y Rodríguez-Dorantes, 2006).

### 3.5. Mecanismos de acción de la $P_4$

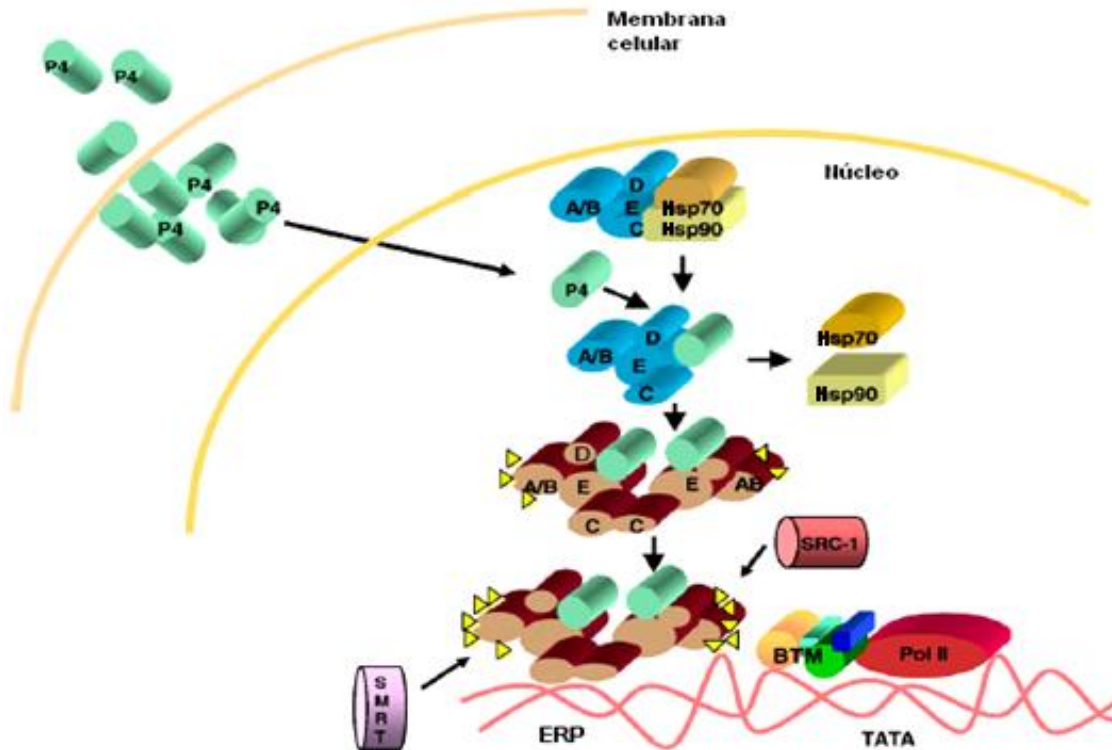
Los mecanismos celulares mediante los cuales la  $P_4$  puede llevar a cabo sus efectos se dividen en dos: clásico y no clásico (Bramley, 2003). El primer mecanismo involucra la interacción de la  $P_4$  con el RP, mientras que el segundo requiere la interacción de la  $P_4$  con canales iónicos y receptores membranales específicos (RPm) y receptores a neurotransmisores, receptores de tipo tirosina cinasa y receptores de siete dominios transmembranales (Figura 8) (Camacho-Arroyo *et al.*, 2003; Camacho-Arroyo *et al.*, 2007).

Por medio del mecanismo clásico se generan cambios en la transcripción de genes específicos después de la interacción de la  $P_4$  con el RP. En general, en el mecanismo de acción del RP, la  $P_4$  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 nuclear que le permite la disociación de las proteínas de choque térmico (Hsp70, 90 y 56), lo que expone la región que le permite ser fosforilada y formar dímeros, resultando en una estructura con alta afinidad a secuencias específicas en el DNA (ERP). Una vez unido al ERP, el complejo ligando-receptor facilita el ensamblaje y la estabilización del complejo de pre-iniciación de la transcripción en los promotores de genes blanco de  $P_4$  (Figura 9), por ejemplo el VEGF y EGFR (Camacho-Arroyo y Rodríguez-Dorantes, 2006; Ward y Weigel, 2009). El receptor activado unido al ligando puede reclutar correguladores, como los coactivadores de receptores a

hormonas esteroideas (SRC) que, de manera dependiente de ligando, facilitan el proceso de transcripción (Scarpin *et al.*, 2009).



**Figura 8.** Esquema de los diferentes mecanismos de acción de la P<sub>4</sub>. Los efectos de la P<sub>4</sub> ocurren por dos diferentes mecanismos celulares: 1) a nivel membranar incluye receptores membranarales y canales iónicos, cuya activación inicia cascadas de señalización mediante la intervención de mensajeros intracelulares. mRP: Receptor membranaral a P<sub>4</sub>, G: Proteína G, αβγ: Subunidades de la proteína G, cAMP: Adenosín monofosfato cíclico, PKA: Proteína Cinasa A, GABA<sub>A</sub>R: Receptor a GABA tipo A, Ca<sup>2+</sup>: Calcio, Cl<sup>-</sup>: Cloro, K<sup>+</sup>: Potasio, PTK: Proteína 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, IP<sub>3</sub>: Inositol Trifosfato 2) en el núcleo, donde el complejo hormona-receptor (P<sub>4</sub>-RP) se une con ERP, ubicados en las regiones reguladoras de los genes blanco en el DNA, y así modulan directamente la expresión génica (Camacho-Arroyo y Rodríguez-Dorantes, 2006).



**Figura 9.** Mecanismo de acción genómico de la  $P_4$ . El RP (dominios A/B, C, D, E) se encuentra en un estado de inactivación, unido a proteínas de choque térmico (Hsp). La  $P_4$  atraviesa la membrana plasmática y la envoltura nuclear, interactúa con su receptor, se liberan las Hsp, el receptor se dimeriza, se fosforila (triángulos), se une a elementos de respuesta a progesterona (ERP) y recluta a correguladores y a la maquinaria de transcripción basal (BTM) junto con la DNA polimerasa II (Pol II), para así regular la expresión de los genes blanco (Modificado de Cabrera-Muñoz *et al.*, 2011).

Mediante el mecanismo no clásico, el cual se menciona de manera muy general ya que este trabajo involucra mayor medida al mecanismo clásico, la  $P_4$  tiene efectos a nivel de membrana y/o de citoplasma y pueden ocurrir a través de la interacción con receptores a  $P_4$  diferentes al intracelular, canales iónicos como los de  $Ca^{2+}$  y  $K^+$ , receptores a neurotransmisores, como es el caso de GABA, y receptores a factores de crecimiento. Estas interacciones producen cambios en el gradiente electroquímico y vías de señalización hasta inducir un cambio fisiológico. De esta manera la  $P_4$  puede regular diferentes funciones en el cerebro (Camacho-Arroyo y Rodríguez-Dorantes, 2006).

### 3.6. P<sub>4</sub> y cáncer

Se conoce que la P<sub>4</sub> participa en la regulación de la expresión de múltiples genes que tienen como función primaria efectos membranales, participación como factores de transcripción, en metabolismo, procesamiento de proteínas y ácidos nucleicos, apoptosis y ciclo celular, y que se han visto involucrados en el desarrollo y crecimiento de diferentes tipos de cáncer (Jacobsen *et al.*, 2005; Sager *et al.*, 2003). Por ejemplo, se ha reportado a partir de estudios realizados en cultivos celulares principalmente derivados de cáncer de mama y útero, que esta hormona participa en la regulación de la expresión de VEGF, EGFR y Ciclina D1 (Liang y Hyder, 2005; Giulianelli *et al.*, 2012; Faivre *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2006).

Se ha determinado que la expresión de VEGF (observada como mRNA y proteína) aumenta con progesterona en células de endometrio (Walter *et al.*, 2005; Kim *et al.*; 2013); también aumenta en las líneas celulares de cáncer de mama BT-474, HCC-1428 y T47-D (Carroll *et al.*, 2013; Liang *et al.*, 2007) y en la línea celular de adenocarcinoma endometrial Ishikawa (Mueller *et al.*, 2003), en la cual también aumenta su secreción (Wen *et al.*, 2009). Las progestinas (por ejemplo, acetato de medroxiprogesterona, norgestrel y R5020) también inducen la expresión de VEGF en útero de ratón, y su secreción en cáncer de pulmón, y al igual que en cáncer de mama, se ha visto que el efecto observado es bloqueado por el antagonista RU486, lo que sugiere que es mediado a través del RP (Hyder *et al.*, 2000).

Por otro lado, se sabe que las progestinas regulan a la alza muchos de los factores de crecimiento que inician vías de señalización implicadas en cáncer de mama, incluidos los miembros de la familia EGFR y sus ligandos, además de proteínas que participan en la regulación del ciclo celular (Lange y Yee, 2009). Se ha encontrado que el tratamiento con progestinas sintéticas incrementa la sensibilidad a la proliferación inducida por EGF en cáncer de mama y que la expresión de EGFR en células de adenocarcinoma endometrial (Zhao *et al.*, 2007) y T47D se encuentra aumentada (Faivre y Lange, 2007; Faivre *et al.*, 2008).



También se ha encontrado que la expresión de las ciclinas está regulada por progestinas en células de cáncer de mama T47-D y BT-474 (Rivas *et al.*, 2012).

Así, la P<sub>4</sub> puede actuar principalmente al sensibilizar las células de cáncer a factores que promueven el desarrollo y crecimiento de los tumores (Lange y Yee, 2009).

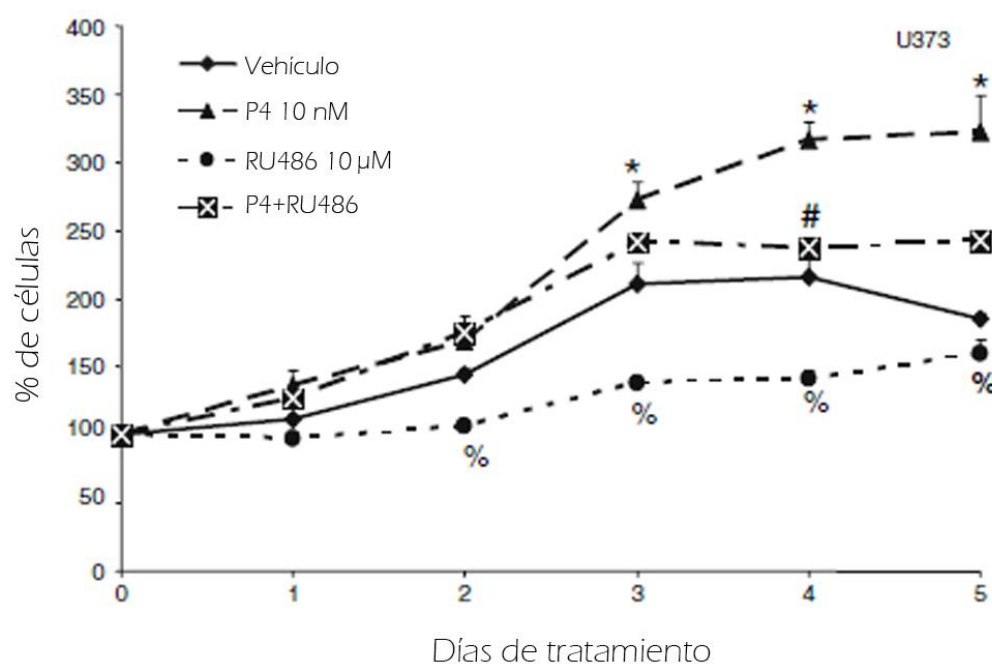
### 3.6.1. P<sub>4</sub> y tumores cerebrales

Como se mencionó anteriormente, a nivel poblacional, la frecuencia de padecimiento de un astrocitoma es mayor en hombres que en mujeres (3:2) (Ohgaki y Kleihues, 2007). Hasta ahora no se tienen muchos datos que puedan explicar este dimorfismo, salvo que 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, lo que sugiere que las hormonas sexuales pueden estar implicadas en el crecimiento de los astrocitomas (Huang *et al.*, 2004; McKinley *et al.*, 2000). Además, se ha visto que este tipo de hormonas, durante la pubertad, modulan la adición diferencial de nuevas células a regiones cerebrales sexualmente dimórficas, hecho que también podría ocurrir en el desarrollo de tumores (Ahmed *et al.*, 2008).

Se sabe que la P<sub>4</sub> puede regular el crecimiento celular en tumores cerebrales (meningiomas, cordomas y astrocitomas) y que este efecto está mediado por su receptor nuclear, además de que se ha sugerido este mismo efecto sobre su desarrollo (Camacho-Arroyo *et al.*, 2000; Carroll *et al.*, 1993; Carroll *et al.*, 1995; Speirs *et al.*, 1997; Xi *et al.*, 2012). En cultivos celulares de meningiomas se ha visto que diferentes dosis de P<sub>4</sub> estimulan el crecimiento celular (Olson *et al.*, 1986), además de que esta hormona puede aumentar la sensibilidad de estos tumores a estímulos mitogénicos (Koper *et al.*, 1994). Estudios en nuestro laboratorio han demostrado que el tratamiento con P<sub>4</sub> aumenta la proliferación de las líneas celulares de astrocitomas humanos U373 y D54 (grados III y IV respectivamente) y se ha sugerido que estos efectos ocurren a través del



mecanismo de acción clásico, ya que se disminuye la proliferación de estas líneas celulares cuando son tratadas además con RU486 (Figura 10). También, la P<sub>4</sub> incrementa en casi 20% el número de células en fase S del ciclo celular en la línea U373, mientras que este aumento fue bloqueado por la administración de RU486 (González-Agüero *et al.*, 2007). Además 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).



**Figura 10.** Efectos de P<sub>4</sub> y RU486 sobre la proliferación de la línea celular U373. El número de células fue determinado mediante exclusión de captación del colorante azul tripán y con el uso de microscopio invertido. Los datos se expresan como media ± S.E.M. \* P < 0.01 vs. Vehículo, # P < 0.01 vs. P<sub>4</sub>; % P < 0.01 vs todos los grupos (González-Agüero *et al.*, 2007).

Otros estudios en nuestro laboratorio han demostrado que en la línea celular D54 la P<sub>4</sub> incrementa significativamente el nivel del mRNA de EGFR y VEGF a las 12 h de tratamiento y el contenido de estas proteínas a las 24 h, mientras que en la línea celular U373, el tratamiento con esta hormona aumenta el contenido de ciclina D1 a nivel de su mRNA y de su proteína. Todos estos efectos fueron bloqueados por el tratamiento con RU486 (Hernández-Hernández *et al.*, 2012). Ya

que la progresión de tumores sólidos depende en gran medida de procesos como vascularización, angiogénesis y diferenciación/desdiferenciación, y que estos genes participan en éstos, se ha sugerido que, por lo menos de forma indirecta, a través de la modificación de la expresión de ciertos genes, la P<sub>4</sub> puede participar en el desarrollo de los astrocitomas (Chekhonin *et al.*, 2013; Sasaki *et al.*, 2013; Hernández-Hernández *et al.*, 2012).

Los datos anteriores, en conjunto, sugieren que la P<sub>4</sub> puede participar en el desarrollo y crecimiento de astrocitomas a través del RP lo que posiblemente involucra un mecanismo de acción genómico de la hormona.

#### 4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se sabe que la  $P_4$  promueve el crecimiento de astrocitomas humanos a través de la interacción con el RP; sin embargo, en estos procesos se desconocen los mecanismos moleculares involucrados, entre los que se encuentra la expresión génica, así como su regulación por  $P_4$  en células derivadas de este tipo de tumores. Es por esto que en el presente trabajo se estudia el patrón de expresión de genes inducido por  $P_4$ , así como la participación del RP en procesos que regulan funciones celulares como es la proliferación, metástasis y muerte celular en la línea celular U373 derivada de astrocitomas humanos de grado III.

#### 5. HIPÓTESIS

- Si la  $P_4$  ejerce sus efectos a través de cambios en la expresión de genes, entonces la administración de esta hormona modificará el patrón de expresión génica en la línea celular U373 derivada de astrocitomas humanos.
- Si la regulación de la expresión génica en astrocitomas humanos por la  $P_4$  es mediada a través de la interacción con su receptor, entonces el tratamiento con RU486, antagonista del RP, bloqueará los cambios en la expresión de genes inducidos por  $P_4$ .

## 6. OBJETIVOS

### 6.1. Objetivo general

Estudiar el efecto de la P<sub>4</sub> sobre el patrón de expresión génica en la línea celular U373 derivada de astrocitomas humanos grado III.

### 6.2. Objetivos particulares

- 1) Identificar los genes que presenten mayor grado de sobreexpresión y subexpresión debida a la administración de P<sub>4</sub> en la línea celular U373 derivada de astrocitomas humanos mediante el análisis por microarreglos.
- 2) Establecer la participación del RP en el patrón de expresión génica en la línea celular U373 mediante el tratamiento con RU486.
- 3) Validar por RT-PCR los datos obtenidos mediante el análisis por microarreglos del efecto de la P<sub>4</sub> y del RU486 en los niveles del mRNA de los genes seleccionados en la línea celular U373.

## 7. METODOLOGÍA

### 7.1. Cultivo celular

La línea celular de astrocitomas humanos U373 (grado III) se cultivó en medio DMEM con rojo fenol suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10% e incubó a 37°C, 95% aire - 5% CO<sub>2</sub> y 95% de humedad. El medio fue cambiado cada 48 horas hasta alcanzar confluencia celular en un 70- 80%. Una vez obtenida la confluencia se contó el número de células en un hemocitómetro (cámara de Neubauer) y se colocó el número necesario de éstas en cajas de Petri de 10 cm con medio DMEM con rojo fenol adicionado con SFB al 10% durante 24-48 h. Posteriormente se les realizaron tres lavados con PBS, pH 7.4 (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 mM), se cambió el medio por DMEM sin rojo fenol suplementado con SFB al 10% libre de hormonas y se incubaron durante 24 h en las condiciones ya mencionadas.

La línea celular U373 proviene de una biopsia de un hombre caucásico de 61 años (Bigner *et al.*, 1981). Son células que se distinguen por presentar extensiones celulares no ramificadas y por tanto tienen una morfología similar a la de los astrocitos (ATCC).

Posteriormente, para estudiar los efectos de la P<sub>4</sub> y la participación del RP en el patrón de expresión génica, las células recibieron los siguientes tratamientos durante 12 h: vehículo (V), ciclodextrina al 0.02% en agua estéril; P<sub>4</sub> (10 nM) acoplada a ciclodextrina; RU486 (10 µM), antagonista de P<sub>4</sub>; y tratamiento conjunto de P<sub>4</sub> (10 nM) + RU486 (10 µM) (González Agüero *et al.*, 2007) (Figura 11).

### 7.2. Extracción de RNA total

Para determinar el perfil de expresión génica, primero se extrajo el RNA total, para lo cual a las células U373 tratadas se les agregó 1 mL de trizol (fenol e isotiocianato de guanidina; Invitrogen) a 4°C, se mantuvieron 5 min en hielo,

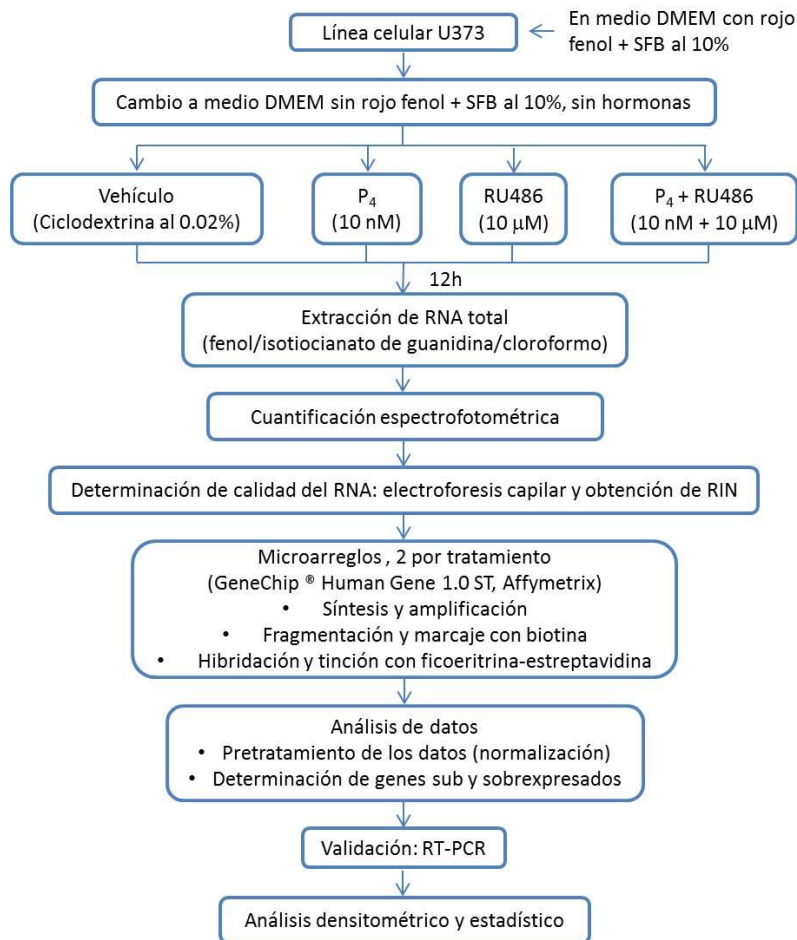
fueron transferidas a un tubo eppendorf de 1.5 mL y se homogenizaron en vórtex por 5 segundos. A continuación se agregaron 200  $\mu$ L de cloroformo, se agitaron en vórtex, se incubaron en hielo durante 5 min y se centrifugaron a 14,000 rpm por 15 min a 4°C. Pasado el tiempo de incubación se obtuvieron dos fases: una inferior de color rojo compuesta por fenol-cloroformo en la cual quedan las proteínas y una acuosa incolora en la parte superior, fase en la cual queda el RNA, mientras que el DNA se mantiene en la interfase.

Posteriormente, se precipitó el RNA, para lo cual se transfirió la fase acuosa a otro tubo eppendorf de 1.5 mL, se agregó isopropanol en un volumen equivalente al extraído y las muestras se mantuvieron a 4°C toda la noche. Transcurrido el tiempo, las muestras se centrifugaron a 14,000 rpm durante 15 min a 4°C. El RNA se observa en una pastilla de color blanco amarillento. Después se retiró el sobrenadante de las muestras mediante decantación, se realizó un lavado con 1 mL de etanol al 75% en agua con DEPC al 0.1% y agitación en vórtex durante 30 segundos, fueron centrifugadas a 7,500 rpm durante 8 min a 4°C y el sobrenadante se decantó. En seguida se realizó otro lavado con 1 mL de etanol al 80% en agua DEPC, se centrifugaron a 7,500 rpm durante 8 min a 4°C, se eliminó todo el sobrenadante y se secó la pastilla formada de cada muestra. Finalmente el RNA se resuspendió en aproximadamente 50  $\mu$ L de agua estéril libre de RNAsas.

La cantidad de RNA extraído se cuantificó espectrofotométricamente a 260 y 280 nm (Thermo Scientific NanoDrop).

Para conocer las condiciones del RNA extraído, se analizó su corrimiento electroforético a través de un método basado en electroforesis capilar, el cual incluye el uso de un chip o plataforma para RNA (RNA 6000 Nano LabChip), un bioanalizador (Agilent 2100 Bioanalyzer) y el software 2100 Expert. En este sistema el RNA de cada muestra es separado y detectado a través de fluorescencia. Se genera un electroferograma, una imagen similar a la obtenida en un gel de agarosa y se calcula la concentración y otros parámetros numéricos que indican la integridad de RNA: la relación entre los RNA ribosomales (rRNA) 28S y 18S y un número de integridad de RNA (RIN), el cual es un parámetro que indica la calidad del RNA eucarionte total de forma que toma en cuenta no solamente la

relación 28S/18S, sino también la cuantificación de productos de degradación del RNA a lo largo de toda su migración electroforética (incluye áreas, intensidades y presencia de picos en los electroferogramas) y puede tomar valores del 1 al 10, donde 1 corresponde a una muestra completamente degradada y 10 a una íntegra.



**Figura 11.** Diagrama de metodología utilizada. RIN: Número de integridad del RNA, SFB: suero fetal bovino, DMEM: Medio Eagle Modificado por Dulbecco.

### 7.3. Microarreglos

La determinación del patrón de expresión génica con los tratamientos administrados se realizó mediante la utilización de microarreglos (2 por tratamiento) de oligonucleótidos GeneChip® Human Gene 1.0 ST Array (Affymetrix) con los cuales es posible detectar más de 28,000 transcritos. Para la

realización de este tipo de ensayos se parte de muestras de RNA total con un volumen mínimo de 10  $\mu\text{L}$ , con una concentración mínima de 70  $\text{ng}/\mu\text{L}$  y un valor de RIN mínimo de 6.0 (ver sección de Extracción de RNA total). En particular para estos experimentos, la concentración mínima fue de aprox. 700  $\text{ng}/\mu\text{L}$  y 8.4 como valor mínimo de RIN. Una vez obtenido el RNA con estas características, se añadieron controles positivos exógenos incluidos en el GeneChip® Eukaryotic Poly-A RNA Control Kit (Affymetrix). Posteriormente, se utilizó el WT Expression Kit (Ambion) en el cual se incluyen reactivos necesarios para la síntesis y amplificación de DNA complementario (cDNA). En este proceso se incorpora deoxiuridina en una proporción predefinida en relación a la timidina. Una vez realizado esto, el cDNA fue fragmentado y marcado en su extremo 3' con el WT Terminal Labeling Kit (Affymetrix). Este kit utiliza una combinación de uracilo DNA glicosilasa (UDG) y la endonucleasa apurínica/apirimidínica 1 (APE 1) para fragmentar el material genético. Después de la fragmentación, el DNA fue marcado mediante la deoxinucleotidil transferasa terminal en presencia de un dXTP biotinilado. Posteriormente se hibridó el cDNA marcado proveniente de cada muestra con las sondas presentes en cada chip o plataforma (se incluyeron controles de hibridación) utilizando el estuche comercial Hybridization Control Kit (Affymetrix). Finalmente las muestras en cada plataforma fueron lavadas y después teñidas con un conjugado de ficoeritrina-estreptavidina en función de poder realizar la detección de la expresión de los genes con el kit Hybridization Wash and Stain Kit (Affymetrix).

### **7.3.1. Análisis de datos**

Una vez procesados los microarreglos se obtuvieron archivos de salida, los cuales contienen la información de intensidad de fluorescencia de cada sonda del microarreglo en forma numérica. Estos documentos tienen el formato de entrada para la mayoría de los programas de análisis de datos de expresión.

Los datos de los microarreglos se procesaron empleando las herramientas y paquetes informáticos del software libre “Bioconductor”. Como primer paso, los



datos se extrajeron con el paquete “oligo”. Posteriormente, se utilizó el paquete “affy” para normalizar los datos de expresión a través de un método por cuantiles, en el cual los valores de las intensidades de fluorescencia presentes en cada muestra se transforman de forma que resultan con idéntica distribución (Bolstad *et al.*, 2003). Finalmente, para identificar los genes diferencialmente expresados se realizó un contraste entre los diferentes grupos de experimentación de los niveles de expresión normalizados; esto mediante el uso de modelos de ajuste lineal con el paquete “limma”. Se utilizó una prueba de t de student y se consideraron como estadísticamente significativas las diferencias en aquellos genes que presentaron una tasa de cambio mayor o igual a 1.5 (Dalman *et al.*, 2012; Yuan *et al.*, 2005; McCarthy y Smyth, 2009) y un valor de  $P < 0.01$ .

## 7.4. RT-PCR

### 7.4.1. Oligonucleótidos

Para realizar la validación de los resultados obtenidos mediante el análisis por microarreglos se amplificó un fragmento de los genes seleccionados para lo cual, a partir de las secuencias publicadas en GenBank, se diseñaron oligonucleótidos específicos (Tabla 2) mediante el programa Primer3 (NCBI). Entre las principales características consideradas para su diseño se encuentran que la longitud fuera de entre 18 y 24 nucleótidos,  $T_m$  arriba de 57 °C, contenido de GC entre 40 y 60% y evitar complementariedad entre los oligos. Aunque no fue una característica necesaria, entre las diferentes opciones de oligonucleótidos diseñados para cada gen se dio preferencia para su elección a aquellos que hibridaran/amplificaran en una unión exón-exón (Tabla 2). Para verificar la especificidad de las secuencias se utilizó el programa BLAST (NCBI).

**Tabla 2.** Oligonucleótidos para determinación de la expresión de los genes elegidos para el proceso de validación.

| Nombre | Secuencia                       | Tamaño del amplificado |
|--------|---------------------------------|------------------------|
| GLIPR2 | FW 5'- CCTGTGGGTGTATGTGCTTG -3' | 157 pb                 |
| GLIPR2 | RV 5'- CCCCAATCCAAATAATCGTG -3' |                        |
| IL7R   | FW 5'- CTGAGGCTCCTTTTGACCTG -3' | 159 pb*                |
| IL7R   | RV 5'- TCACATGCGTCCATTTGTTT -3' |                        |
| SREBF1 | FW 5'- TGCATTTTCTGACACGCTTC -3' | 171 pb*                |
| SREBF1 | RV 5'- CCAAGCTGTACAGGCTCTCC -3' |                        |
| IL18   | FW 5'- GGAATTGTCTCCCAGTGCAT -3' | 177 pb*                |
| IL18   | RV 5'- ACTGGTTCAGCAGCCATCTT -3' |                        |
| TGFβ2  | FW 5'- TGCTTTGGCTTTCTGGTTCT -3' | 199 pb                 |
| TGFβ2  | RV 5'- TTTGTTTGTGGTGCAGTGGT -3' |                        |
| MAP1B  | FW 5'- AATCGAGAAGACCAGCCTGA -3' | 245 pb                 |
| MAP1B  | RV 5'- AATCCGTTGAGCGGTGTAAC -3' |                        |
| ANLN   | FW 5'- ATGCAGTGTGGTGCACATTT -3' | 195 pb                 |
| ANLN   | RV 5'- AACCCAAACACTTTGGCAAG -3' |                        |
| HBG1   | FW 5'- GCAAGAAGGTGCTGACTTCC -3' | 176 pb*                |
| HBG1   | RV 5'- GAATTCTTTGCCGAAATGGA -3' |                        |
| STARD4 | FW 5'- GGCGAGTTGCTAAGAAAACG -3' | 219 pb*                |
| STARD4 | RV 5'- TGTAACGCATCACACAGCAA -3' |                        |
| AOC3   | FW 5'- CAGGGGACACTGAACCTTGT -3' | 233 pb                 |
| AOC3   | RV 5'- CCTTTCCAGCTCAGCTATGG -3' |                        |
| 18S    | FW 5'- CGCGTTTCTATTTTGTGGT -3'  | 219 pb                 |
| 18S    | RV 5'-AGTCGGCATCGTTTATGGTC -3'  |                        |

FW: oligonucleótido sentido, RV: oligonucleótido antisentido

\* Amplificación de unión exón-exón

#### 7.4.2. Síntesis de cDNA

Se agregaron los siguientes componentes en un tubo eppendorf: oligo (dT)<sub>12-18</sub>, un estimado de 3 µg de RNA total y agua estéril libre de RNasas (el volumen

necesario para tener un total de 11.5  $\mu$ L). La mezcla se incubó a 65°C durante 5 min y se mantuvo en hielo.

Posteriormente se añadió buffer para primera hebra 5X, RNasa OUT, dATP, dTTP, dGTP, dCTP y la enzima M-MuLV RT (Thermo Scientific); la muestra se incubó a 37°C durante 60 min. Para inactivar la reacción se calentó a 70°C durante 10 min. Los productos obtenidos se almacenaron en congelación a -20°C.

#### **7.4.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

Con la finalidad de determinar la temperatura óptima de alineamiento de los oligonucleótidos, se realizó una curva de temperaturas (58, 60, 62, 64 y 66 °C) y para definir el número de ciclos necesarios para la amplificación del fragmento de los genes seleccionados se realizó una curva de ciclos (20, 25, 30, 35 y 40 ciclos) (Anexo 1, Figura 24).

Para la reacción de amplificación se realizó un calentamiento inicial durante 10 min a 94°C para asegurar la completa desnaturalización del cDNA. Posteriormente se efectuó el número de ciclos de amplificación necesarios para cada gen. La etapa de extensión final se llevó a cabo a 72°C durante 5 min.

Para normalizar las posibles diferencias en la cantidad cargada de cDNA, se realizó también la determinación de la expresión del gen del rRNA 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% teñidos con un agente intercalante y se observaron en un transiluminador de rayos UV. Se utilizó una cámara digital Canon PowerShot SD1400 IS para obtener la imagen digital de las bandas observadas en cada gel.

#### **7.4.4. Análisis densitométrico y estadístico**

Las imágenes obtenidas fueron sometidas a un análisis densitométrico para cuantificar el grado de expresión de los genes en estudio de acuerdo a la

intensidad de cada banda mediante el programa Chemilmager 4400 (Cell Biosciences, USA). Para cada experimento los datos resultantes se normalizaron con los de 18S.

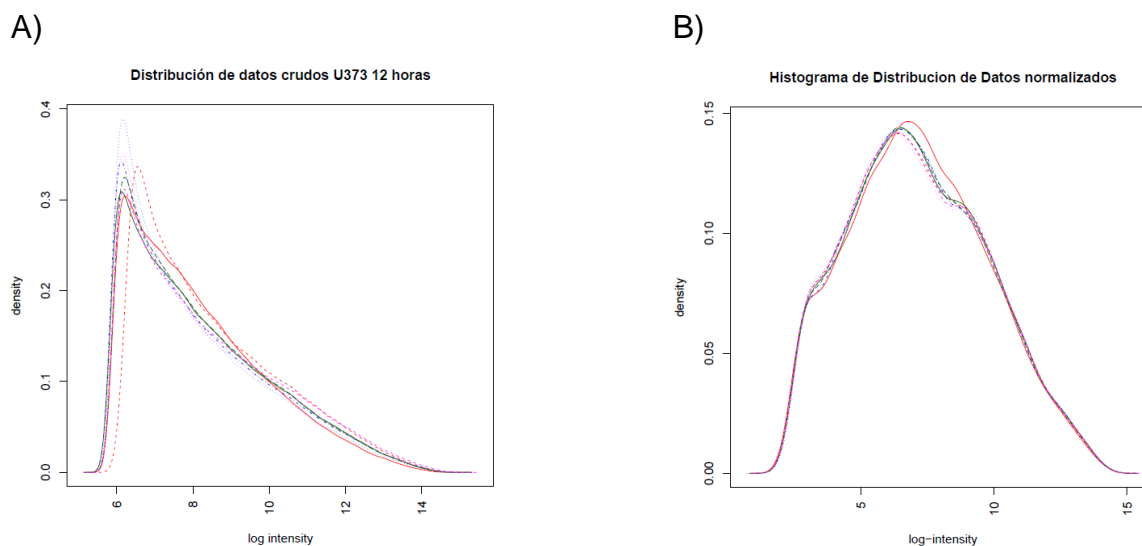
A los datos obtenidos se les realizó un análisis estadístico a través de la prueba de ANOVA de una vía, seguida por una prueba de Tukey para la comparación entre grupos. Se utilizó el programa GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc., USA) para calcular los valores de probabilidad. En todos los casos se utilizó un intervalo de confianza del 95%, por lo que se consideraron como estadísticamente significativos aquellos datos con un valor de  $p < 0.05$ .

## 8. RESULTADOS

### 8.1. Análisis de expresión mediante microarreglos

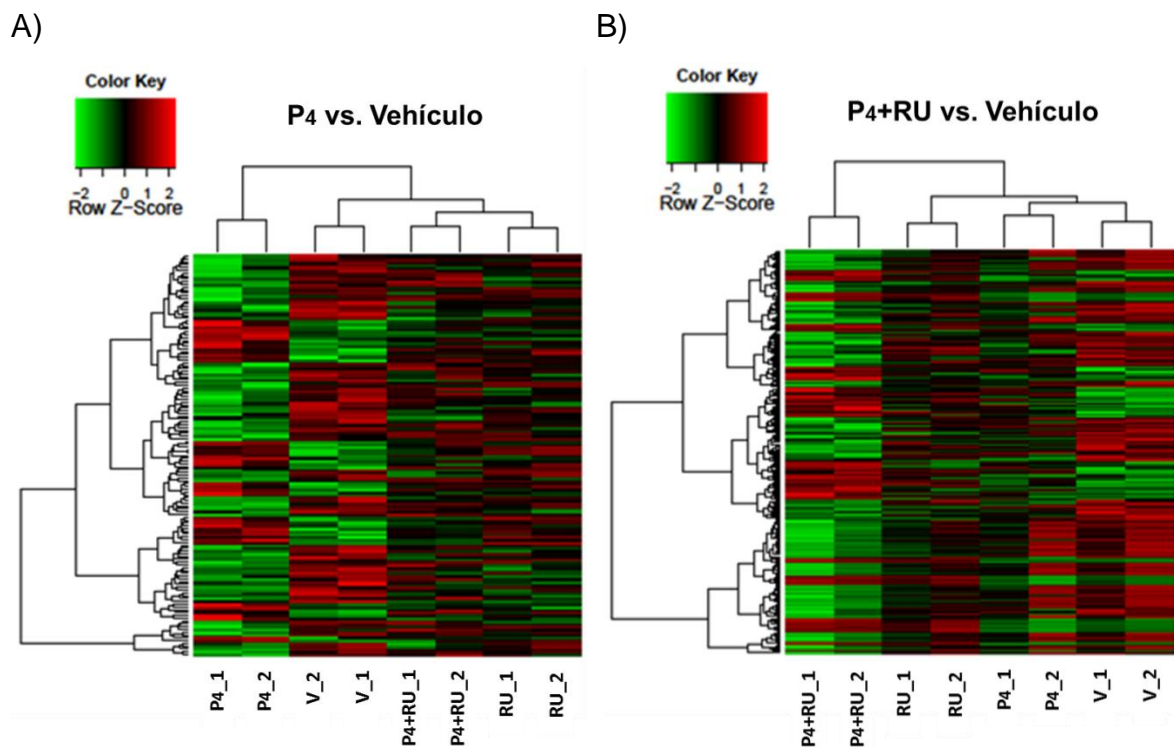
Para estudiar la regulación por  $P_4$  del patrón de expresión génica por  $P_4$  en la línea celular U373 y determinar el posible papel del RP en esta regulación, se realizó un ensayo de microarreglos para aproximadamente 28,000 genes (Human Gene 1.0 ST Array) con cDNA obtenido mediante dos ciclos de síntesis a partir de RNA total extraído de células tratadas con vehículo (V, ciclodextrina al 0.02%),  $P_4$  (10 nM),  $P_4$  (10 nM) + RU486 (10  $\mu$ M; antagonista del RP) y RU486 (10  $\mu$ M).

Se utilizaron dos arreglos para cada tratamiento y los datos de expresión obtenidos se ajustaron mediante una normalización por cuantiles (a través del paquete *limma* y *affy* de Bioconductor) la cual considera que todos los arreglos tienen la misma distribución (aunque no asume ningún tipo de distribución en particular). De este proceso se obtuvieron histogramas o “*density plot*” pre y postnormalización (Figura 12) en los cuales se observa que después de ser normalizados, los datos de expresión de todos los arreglos adquieren una distribución similar.

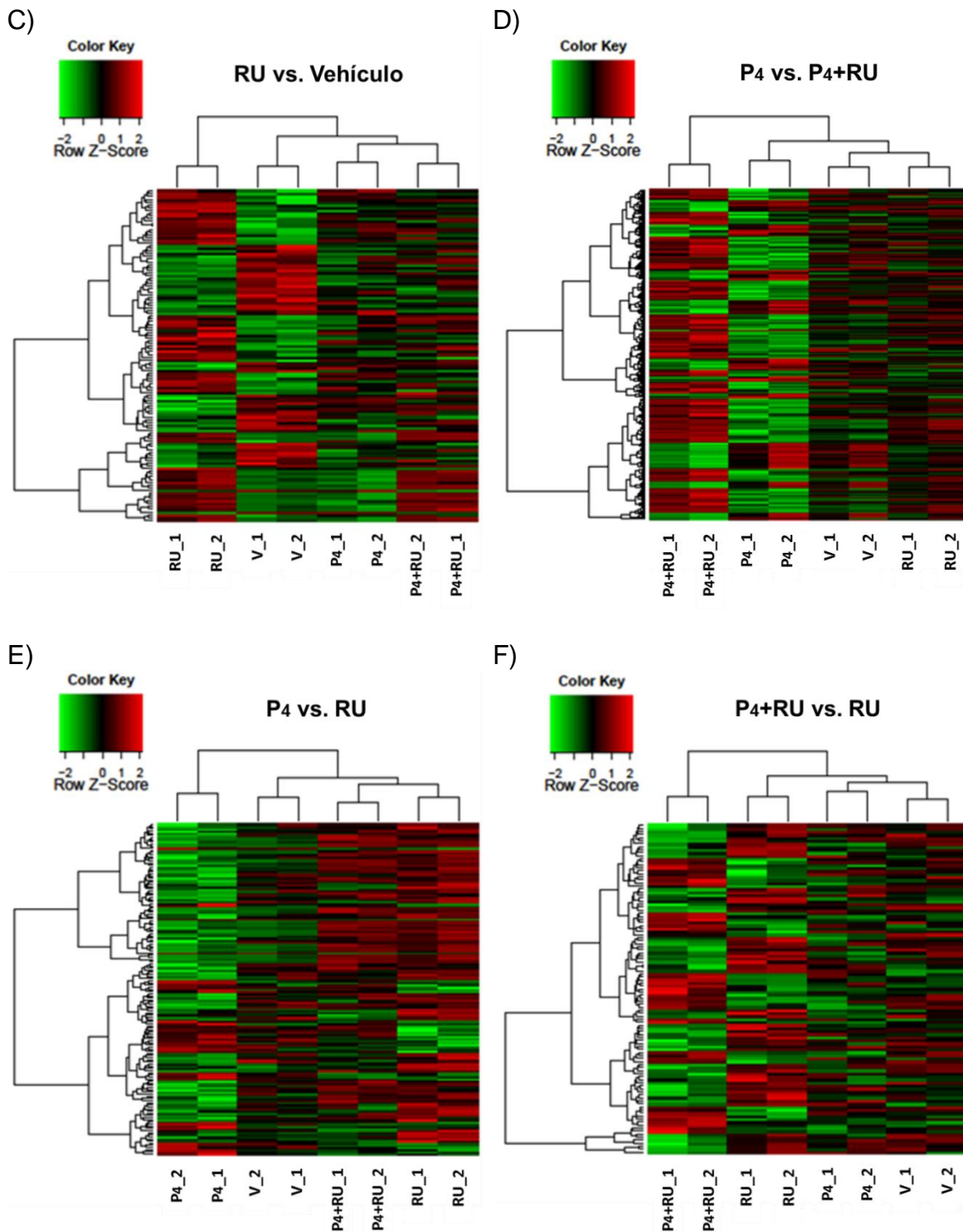


**Figura 12.** Histogramas de distribución de datos de expresión génica de los 8 microarreglos a las 12 h de tratamiento. A) Gráfica de datos antes de ser normalizados. B) Gráfica de datos normalizados. Cada línea representa un arreglo.

Posteriormente para la organización de los datos de expresión obtenidos se realizó un agrupamiento jerárquico no supervisado (agrupamiento dado sin utilizar información externa para organizar los grupos de cierta manera) del cual, como representación gráfica, fueron obtenidos dendrogramas o árboles de similitud. En éstos, los objetos similares se conectan mediante enlaces y su posición está determinada por el grado de similitud/diferencia entre los objetos. Además, este agrupamiento fue también graficado en una matriz conocida como mapa de calor, en el cual los niveles de expresión se representan como colores dentro de una escala. Se consideró estadísticamente significativa la expresión de aquellos genes que tuviera un valor de  $P < 0.05$  al compararlos entre tratamientos y se generó un mapa de calor para cada comparación entre tratamientos (Figura 13).



**Figura 13.** Mapas de calor que muestran el agrupamiento jerárquico no supervisado basado en el grupo de genes que presentan diferencias significativas en su expresión entre los diferentes tratamientos. A) Comparación de  $P_4$  vs. vehículo. B) Comparación de  $P_4+RU486$  vs. vehículo. El color verde indica subexpresión, el color rojo indica sobreexpresión y el negro indica sin cambio. Para todos los casos se muestran los resultados de los dos microarreglos que se realizaron por tratamiento. (Continúa en la siguiente página).



**Figura 13** (Continuación). Mapas de calor que muestran el agrupamiento jerárquico no supervisado basado en el grupo de genes que presentan diferencias significativas en su expresión entre los diferentes tratamientos. C) Comparación de RU486 vs. vehículo. D) Comparación de P<sub>4</sub> vs. P<sub>4</sub>+RU486. E) Comparación de P<sub>4</sub> vs. RU486. F) Comparación de P<sub>4</sub>+RU486 vs. RU486. El color verde indica subexpresión, el color rojo indica sobreexpresión y el negro indica sin cambio. Para todos los casos se muestran los resultados de los dos microarreglos que se realizaron por tratamiento.

Una vez realizado el contraste de los niveles de expresión normalizados, se obtuvieron entonces las listas de genes diferencialmente expresados. Así como en el caso de los mapas de calor, se tiene una lista para cada comparación entre los diferentes grupos de experimentación (6 listas en total de expresión diferencial); esto es, P<sub>4</sub> vs. V, P<sub>4</sub>+RU vs. V, RU vs. V, P<sub>4</sub> vs. P<sub>4</sub>+RU, P<sub>4</sub> vs. RU y, P<sub>4</sub>+RU vs. RU (Tablas 6-11 en Anexo -12.2). Los datos mostrados reflejan el promedio de expresión entre los dos arreglos.

Con la finalidad de poder realizar comparaciones de los genes diferencialmente expresados y de acotar la gran cantidad de datos obtenidos, primero, mediante la intersección de las listas de expresión diferencial, se determinó qué genes aparecían en al menos dos de éstas (sin importar si era por sobre o subexpresión). De estas intersecciones se obtuvo una lista con un número menor de genes.

A continuación, como una aproximación para la elección de los genes que podrían ser utilizados en el procedimiento de validación de los microarreglos y que son relevantes para el desarrollo de astrocitomas, se decidió enfocarse en los efectos de cada tratamiento respecto al vehículo. Entonces, para los genes en la nueva lista (proveniente de las intersecciones), se determinó si éstos se encontraban subexpresados, sobreexpresados o sin cambio (nivel basal), ya sea en la comparación de P<sub>4</sub> vs. V, P<sub>4</sub>+RU vs. V o RU vs. V. De esta depuración y selección de datos se obtuvo la siguiente lista (Tabla 3).

**Tabla 3.** Genes con expresión diferencial y su cambio entre los distintos tratamientos comparados con vehículo (V). P<sub>4</sub>: progesterona, RU: RU486, B: basal (sin cambio), ↑: incremento, ↓: disminución.

| Nombre del gen | P <sub>4</sub> vs. V | P | P <sub>4</sub> +RU vs. V | P      | RU vs. V | P      |
|----------------|----------------------|---|--------------------------|--------|----------|--------|
| CHAC1          | B                    |   | ↑ 2.0                    | <0.001 | ↑ 1.7    | <0.001 |
| ASNS           | B                    |   | ↑ 2.0                    | <0.001 | ↑ 2.0    | <0.001 |
| SLC25A20       | B                    |   | ↑ 1.6                    | <0.001 | ↑ 1.5    | <0.001 |
| CPT1A          | B                    |   | ↑ 2.1                    | <0.001 | ↑ 1.8    | <0.001 |
| PCK2           | B                    |   | ↑ 1.9                    | <0.001 | ↑ 1.8    | <0.001 |
| YARS           | B                    |   | ↑ 1.7                    | <0.001 | ↑ 1.4    | 0.005  |
| GLIPR2         | B                    |   | ↑ 1.6                    | <0.001 | ↑ 1.5    | 0.001  |



| Nombre del gen | P <sub>4</sub> vs. V | P      | P <sub>4</sub> +RU vs. V | P      | RU vs. V | P      |
|----------------|----------------------|--------|--------------------------|--------|----------|--------|
| SLC6A9         | B                    |        | ↑ 2.3                    | <0.001 | ↑ 2.0    | 0.001  |
| PSAT1          | B                    |        | ↑ 1.7                    | 0.001  | ↑ 1.6    | 0.002  |
| NUPR1          | B                    |        | ↑ 2.0                    | <0.001 | ↑ 2.0    | <0.001 |
| SLC1A4         | B                    |        | ↑ 1.7                    | 0.001  | ↑ 1.6    | 0.001  |
| PHGDH          | B                    |        | ↑ 1.7                    | 0.002  | ↑ 1.6    | 0.002  |
| CBS            | B                    |        | ↑ 2.1                    | 0.001  | ↑ 2.0    | 0.001  |
| ABCA1          | B                    |        | ↓ 1.8                    | 0.001  | ↓ 1.6    | 0.003  |
| MTHFD2         | B                    |        | ↑ 1.6                    | <0.001 | ↑ 1.4    | 0.004  |
| AARS           | B                    |        | ↑ 1.5                    | 0.002  | ↑ 1.4    | 0.005  |
| TRIB3          | B                    |        | ↑ 1.7                    | 0.003  | ↑ 1.7    | 0.003  |
| GDF15          | B                    |        | ↑ 1.9                    | 0.005  | ↑ 1.8    | 0.009  |
| ZNF487         | B                    |        | B                        |        | ↑ 1.5    | 0.003  |
| SNORA41        | ↓ 1.7                | 0.002  | ↓ 1.6                    | 0.003  | B        |        |
| FLJ16171       | ↑ 1.7                | 0.003  | ↑ 1.7                    | 0.003  | ↑ 1.7    | 0.002  |
| SNORD116-26    | ↓ 1.9                | 0.004  | ↓ 2.5                    | 0.001  | B        |        |
| SIAE           | ↓ 1.6                | 0.008  | ↓ 1.7                    | 0.005  | B        |        |
| LTV1           | B                    |        | ↓ 1.5                    | 0.009  | B        |        |
| SNORD13        | B                    |        | ↓ 1.5                    | 0.009  | B        |        |
| NUCKS1         | B                    |        | ↓ 1.7                    | 0.004  | B        |        |
| ECHDC1         | B                    |        | ↓ 1.8                    | 0.003  | B        |        |
| C5orf36        | B                    |        | ↓ 1.9                    | 0.003  | B        |        |
| MST1           | B                    |        | ↑ 1.7                    | <0.001 | ↑ 1.5    | 0.001  |
| OR2M3          | B                    |        | ↓ 1.5                    | 0.001  | ↓ 1.5    | <0.001 |
| HIST1H1T       | B                    |        | ↓ 1.5                    | 0.001  | ↓ 1.6    | <0.001 |
| FLJ45950       | B                    |        | ↓ 2.2                    | 0.002  | ↓ 1.8    | 0.008  |
| STARD4         | B                    |        | ↓ 1.7                    | 0.005  | ↓ 1.6    | 0.007  |
| IL7R           | B                    |        | ↓ 1.5                    | 0.006  | ↓ 1.4    | 0.008  |
| CD177          | B                    |        | ↑ 1.5                    | 0.008  | ↑ 1.8    | 0.002  |
| SREBF1         | B                    |        | B                        |        | ↓ 1.5    | <0.001 |
| SNORA14A       | ↓ 1.8                | <0.001 | B                        |        | B        |        |
| FABP4          | ↓ 1.9                | 0.005  | B                        |        | B        |        |
| SNORA28        | ↓ 1.6                | 0.003  | B                        |        | B        |        |
| SNORD38B       | ↓ 1.5                | 0.007  | B                        |        | B        |        |
| PNPLA4         | ↑ 1.5                | 0.002  | B                        |        | B        |        |
| SNORD53        | ↓ 1.5                | 0.009  | B                        |        | B        |        |
| SNORA14B       | ↓ 1.5                | <0.001 | B                        |        | B        |        |
| SNORD25        | ↓ 1.8                | 0.003  | B                        |        | B        |        |
| VTRNA1-1       | ↓ 2.2                | 0.006  | B                        |        | B        |        |
| IL18           | ↓ 1.5                | 0.003  | B                        |        | B        |        |

| Nombre del gen | P <sub>4</sub> vs. V | P     | P <sub>4</sub> +RU vs. V | P      | RU vs. V | P      |
|----------------|----------------------|-------|--------------------------|--------|----------|--------|
| AOC3           | ↑ 1.5                | 0.003 | B                        |        | B        |        |
| SESN2          | B                    |       | ↑ 1.5                    | 0.001  | B        |        |
| GPT2           | B                    |       | ↑ 1.6                    | <0.001 | B        |        |
| ARHGEF2        | B                    |       | ↑ 1.5                    | 0.001  | B        |        |
| CARS           | B                    |       | ↑ 1.5                    | 0.001  | B        |        |
| SEMA6D         | B                    |       | ↓ 1.7                    | 0.001  | B        |        |
| ETV4           | B                    |       | ↑ 1.5                    | 0.009  | B        |        |
| DLGAP5         | B                    |       | ↓ 2.1                    | 0.007  | B        |        |
| TGFβ2          | B                    |       | ↑ 1.5                    | 0.008  | B        |        |
| SLC39A10       | B                    |       | ↓ 2.2                    | 0.002  | B        |        |
| PTGES          | B                    |       | ↑ 1.5                    | 0.006  | B        |        |
| ABCD3          | B                    |       | ↓ 1.5                    | 0.005  | B        |        |
| TET2           | B                    |       | ↓ 1.8                    | 0.006  | B        |        |
| SESN3          | B                    |       | ↓ 1.8                    | 0.009  | B        |        |
| CTAGE5         | B                    |       | ↓ 1.7                    | 0.007  | B        |        |
| PSD3           | B                    |       | ↓ 1.6                    | 0.008  | B        |        |
| ZBTB6          | B                    |       | ↓ 1.6                    | 0.007  | B        |        |
| DDX46          | B                    |       | ↓ 1.8                    | 0.008  | B        |        |
| EPM2AIP1       | B                    |       | ↓ 1.7                    | 0.006  | B        |        |
| MAP1B          | B                    |       | ↓ 1.5                    | 0.006  | B        |        |
| GPR137C        | B                    |       | ↓ 1.5                    | 0.005  | B        |        |
| AKAP12         | B                    |       | ↓ 1.5                    | 0.007  | B        |        |
| FAM35A         | B                    |       | ↓ 1.5                    | 0.007  | B        |        |
| EIF3A          | B                    |       | ↓ 1.6                    | 0.009  | B        |        |
| ERCC6L         | B                    |       | ↓ 1.6                    | 0.004  | B        |        |
| ANLN           | B                    |       | ↓ 1.9                    | 0.008  | B        |        |
| PJA2           | B                    |       | ↓ 1.6                    | 0.008  | B        |        |
| CXADR          | B                    |       | ↓ 1.7                    | 0.009  | B        |        |
| C1orf58        | B                    |       | ↓ 1.7                    | 0.006  | B        |        |
| TOPBP1         | B                    |       | ↓ 1.6                    | 0.009  | B        |        |
| HBG1           | ↑ 2.7                | 0.001 | B                        |        | ↑ 3.2    | <0.001 |
| HBG2           | ↑ 2.7                | 0.001 | B                        |        | ↑ 3.2    | <0.001 |
| HSD17B7P2      | ↓ 1.5                | 0.004 | B                        |        | ↓ 1.5    | 0.006  |
| NCRNA00200     | ↑ 1.5                | 0.008 | B                        |        | ↑ 1.5    | 0.008  |

Los números en las columnas de comparación entre tratamientos indican la tasa de cambio; en gris se indican aquellos con valor menor a 1.5.

Posteriormente, se realizó una revisión de la función general del producto codificado por los genes mostrados en la Tabla 3. De manera general, se encontraron genes involucrados en metabolismo y transporte, ciclo celular y apoptosis, procesamiento de ácidos nucleicos y proteínas, proliferación celular, metástasis, adhesión y patogénesis, respuesta inmune, proteínas de ensamblaje, citoesqueleto, proteínas de membrana y RNAs no codificantes, además de algunos que participan en otros procesos o que a sus productos no se les ha atribuido (o no se ha estudiado) hasta ahora una función.

A partir de la revisión de su función, su tasa de cambio y su comportamiento respecto al vehículo, se eligieron 10 genes para realizar el proceso de validación de los microarreglos. Entre los criterios de elección de estos genes, se encuentra el hecho de que de acuerdo a su función principal, pudieran tener un papel importante en el desarrollo de cáncer, y en específico de astrocitomas. En cuanto a esto, se eligieron genes que participen en procesos como respuesta inmune, transcripción, función del citoesqueleto, metabolismo y transporte, y proliferación, adhesión y patogénesis (debió haber al menos un gen para cada una de las funciones seleccionadas). También se consideró a aquéllos que tuvieran una tasa de cambio  $\geq$  a 1.5 para al menos uno de los tratamientos respecto al vehículo; se incluyó al gen con mayor tasa de cambio en su expresión. Además, se tomó en cuenta que los genes elegidos reflejaran las distintas posibilidades de efecto de los distintos tratamientos. Se excluyó a los pseudogenes, así como a los genes cuyo producto está relacionado con RNAs no codificantes (entre los que se encuentran aquéllos que su símbolo inicia con “SNOR” y “NCRNA”). Los genes elegidos y sus funciones y características generales se muestran en la siguiente tabla (Tabla 4).

**Tabla 4.** Genes elegidos para validación, su función y características.

| Gen    | Nombre completo, características y función   |
|--------|--|
| GLIPR2 | <p>Proteína relacionada a la patogénesis por glioma 2</p> <p>Tamaño: ~27 kb; 154 aa, ~17 kDa. Localización: 9p13.3</p> <p>Aunque su función no ha sido bien caracterizada, se ha encontrado regulada a la alta en reacción al ataque de patógenos. Está localizada dentro de microdominios enriquecidos en lípidos. Se encuentra anclada a la membrana y no se ha detectado libre en el citoplasma.</p> <p>Se ha propuesto que puede funcionar como modulador de la respuesta inmune dentro del tracto reproductivo femenino, además de estimular la motilidad de espermatozoides (Aalberts <i>et al.</i>, 2012). Se ha encontrado también que podría aumentar la activación de fibroblastos e inducir la transición epitelio mesénquima (Baxter <i>et al.</i>, 2007).</p> |
| TGFβ2  | <p>Factor de crecimiento transformante β-2</p> <p>Tamaño: ~98 kb; 414 aa, ~48 kDa. Localización: 1q41</p> <p>Este gen codifica una proteína multifuncional, la cual regula la proliferación, diferenciación, adhesión, migración y otras funciones en muchos tipos celulares a través de sus receptores transmembranales tipos I y II (TGFβR1 y TGFβR2). La disrupción de su función ha sido implicada en gran variedad de tipos de cáncer.</p> <p>Esta proteína tiene efectos inhibidores sobre el crecimiento dependiente de IL2 las células T (Buck y Knabbe, 2006; Govinden y Bhoola, 2003; Zheng <i>et al.</i>, 2007).</p>  |
| AOC3   | <p>Proteína 1 de adhesión vascular</p> <p>Tamaño: ~6.9 kb; 763 aa, ~84 kDa. Localización: 17q21</p> <p>La proteína producto de este gen cataliza la conversión oxidativa de aminas a aldehídos en presencia de cobre y el cofactor quinona. Posee también propiedades de adhesión celular. Esta función de adhesión puede participar en la recirculación de linfocitos ya que media la unión de estas células a células vasculares endoteliales de nódulos periféricos.</p> <p>Se ha asociado también con migración y metástasis en cáncer como el colorrectal, cáncer de próstata y melanoma (Jalkanen y Salmi, 2007; Toiyama, <i>et al.</i>, 2009; Ekblom <i>et al.</i>, 1999; Forster-Horváth <i>et al.</i>, 2004).</p>   |

|       |   |
|-------|---|
| HBG1  | <p>Gamma A hemoglobina</p> <p>Tamaño: ~1.8 kb; 147 aa, ~16 kDa. Localización: 11p15</p> <p>Este gen, junto los demás de gamma globina se encuentran sobrexpresados en hígado fetal y médula ósea Su producto forma parte de la hemoglobina fetal, la cual es reemplazada al nacimiento por otro tipo de hemoglobina. Existen afecciones en las cuales la producción de hemoglobina fetal continúa después del nacimiento y hasta la adultez.</p> <p>Se ha reportado también que algunos tratamientos dirigidos para diferenciar células malignas resultan en la síntesis de hemoglobina fetal (Patrinos <i>et al.</i>, 2005; Kieslich <i>et al.</i>, 2003).</p> |
| IL7R  | <p>Receptor a interleucina 7</p> <p>Tamaño: ~27 kb; 459 aa, ~52 kDa. Localización: 5p13.2</p> <p>Se ha encontrado que esta proteína junto con su ligando (IL7) tiene un papel crítico en el desarrollo y crecimiento de los precursores de las células linfoides. Además está encargada de boquear la apoptosis durante la diferenciación y activación de los linfocitos T. Sus defectos funcionales se han asociado con la patogénesis de inmunodeficiencias severas mixtas.</p> <p>Por otro lado, se ha reportado que altos niveles de este receptor correlacionan con la agresividad tumoral en el cáncer de mama (Al-Rawi <i>et al.</i>, 2004).</p>         |
| IL18  | <p>Interleucina 18</p> <p>Tamaño: ~21 kb; 193 aa, ~22 kDa. Localización: 11q22</p> <p>La proteína codificada por este gen es una citocina proinflamatoria que aumenta la actividad de las células NK y estimula la producción de interferón gamma en linfocitos T.</p> <p>Se ha reportado que esta citocina participa en la carcinogénesis y que es secretada por células tumorales, por ejemplo, en cáncer de riñón (Sözen <i>et al.</i>, 2004) y de próstata (Lebel-Binay <i>et al.</i>, 2003).</p>   |
| MAP1B | <p>Proteína asociada a microtúbulos 1B</p> <p>Tamaño: ~102 kb; 2468 aa, ~270 kDa. Localización: 5q13</p> <p>La proteína codificada por este gen participa en el ensamblaje de los microtúbulos, lo cual es un paso esencial en la neurogénesis. El producto de este gen es un precursor, el cual, a través de procesamiento proteolítico, genera la cadena pesada final de MAP1B y la cadena ligera LC1. Se sabe que tiene un papel importante en el desarrollo y función del sistema nervioso.</p>   |

|        |   |
|--------|---|
|        | <p>Estudios reportan que en células de meduloblastoma esta proteína puede unirse al supresor de tumores p53 de forma que su interacción regula negativamente su actividad, lo cual lleva a la inhibición de la apoptosis inducida por algunos antitumorales (Lee <i>et al.</i>, 2008).</p>  |
| ANLN   | <p>Anilina, proteína de unión a actina</p> <p>Tamaño: ~64 kb; 2468 aa, ~124 kDa. Localización: 5q13</p> <p>Se sabe que el producto de este gen es requerido para la citocinesis e interactúa con la F-actina.</p> <p>Alteraciones en este gen se han relacionado con cáncer bucal. Además, existen datos que señalan que su regulación a la alta es una característica común en el proceso carcinogénico del tejido pulmonar (Suzuki <i>et al.</i>, 2005).</p>  |
| SREBF1 | <p>Factor de transcripción de unión a elementos regulados por esterol 1</p> <p>Tamaño: ~27 kb; 1147 aa, ~122 kDa. Localización: 17p11.2</p> <p>El gen codifica para la proteína SREBP, que es sintetizada como un precursor que está anclado a la envoltura nuclear y al retículo endoplásmico. Una vez que es cortado, la proteína madura se transloca al núcleo y activa la transcripción. Los esteroides inhiben el corte del precursor y la forma madura nuclear es degradada rápidamente de manera que se reduce la transcripción.</p> <p>Es un factor de transcripción requerido para la homeostasis de lípidos. Regula la transcripción del gen del receptor a LDL, así como la vía de síntesis de ácidos grasos y en menor medida la de síntesis de colesterol.</p> <p>Se ha encontrado también que puede participar en vías de señalización relacionadas con cáncer (Shao y Espenshade, 2012).</p> |
| STARD4 | <p>Proteína 4 que contiene el dominio de transferencia de lípidos relacionada a STAR</p> <p>Tamaño: ~17 kb; 205 aa, ~24 kDa. Localización: 5q22</p> <p>El producto de este gen puede participar en el transporte intracelular de esteroides u otros lípidos; por ejemplo, es capaz de unir colesterol.</p> <p>El nivel de expresión de este gen se ha relacionado con estrés en el retículo endoplásmico (Yamada <i>et al.</i>, 2006).</p>  |

## 8.2. Validación de algunos resultados obtenidos por microarreglos

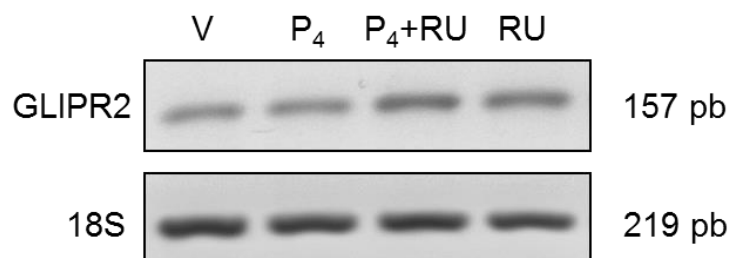
Una vez realizados los microarreglos y su análisis, es necesario confirmar los datos obtenidos, sobre todo aquellos que hayan resultado de mayor interés, ya que en este tipo de ensayos existen varios aspectos técnicos que pueden producir resultados erróneos en cuanto a la subexpresión o sobreexpresión de genes. Todo esto para así poder generar resultados que realmente reflejen lo que ocurre a nivel transcripcional, y establecer que los cambios observados se encuentran fuertemente relacionados a la condición que se está estudiando (Russell *et al.*, 2009; True y Feng, 2005). Con la finalidad de validar los datos de expresión obtenidos a partir de los microarreglos en la línea celular U373, se realizó la determinación, mediante la técnica de RT-PCR (técnica relativamente de bajo costo), de los niveles de expresión de los genes previamente seleccionados, en la misma línea celular y en las mismas condiciones que para los microarreglos (vehículo, P<sub>4</sub>, P<sub>4</sub>+RU486 y RU486 durante 12 h). Para todos los casos los resultados son producto de al menos tres experimentos independientes.

Para el caso de la expresión del mRNA de GLIPR2 es posible observar que ésta no es alterada con la administración de P<sub>4</sub>, sin embargo, se demostró un aumento significativo con el tratamiento de RU486, el cual también se presenta en nivel similar cuando el antagonista se aplica en conjunto con P<sub>4</sub> (Figura 14).

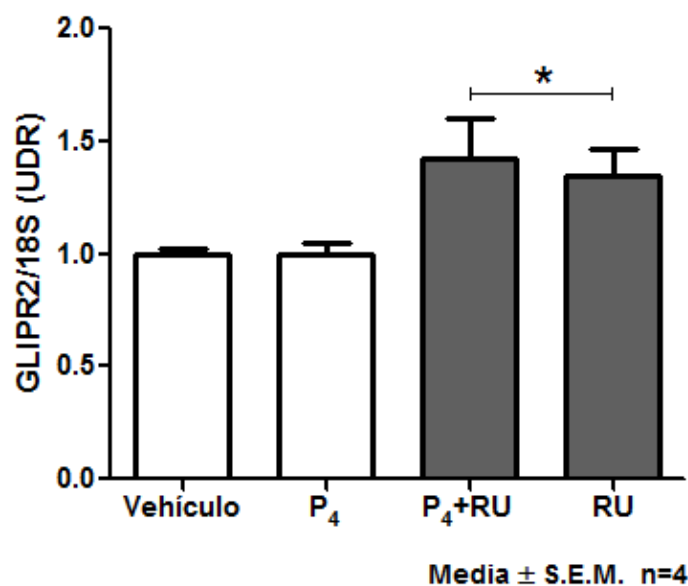
En cuanto a la expresión de otro de los genes en estudio, TGFβ<sub>2</sub>, se observó que con todos los tratamientos hay un aumento estadísticamente significativo respecto al vehículo, y aunque no hay diferencia significativa entre los otros grupos experimentales, los valores más altos fueron producidos por el tratamiento conjunto de P<sub>4</sub>+RU (Figura 15).

A)

Proteína relacionada a patogénesis por glioma 2  
(GLIPR2)



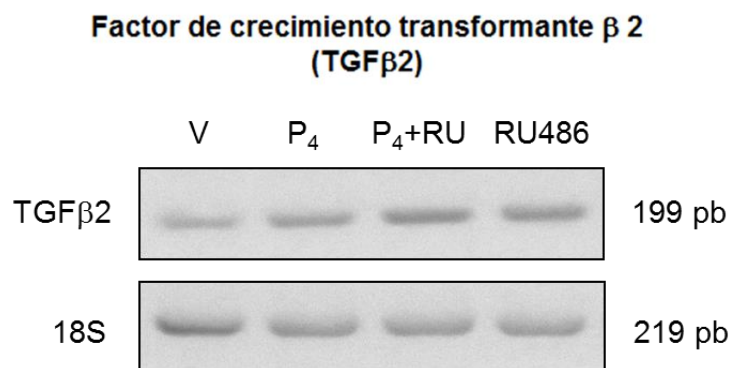
B)



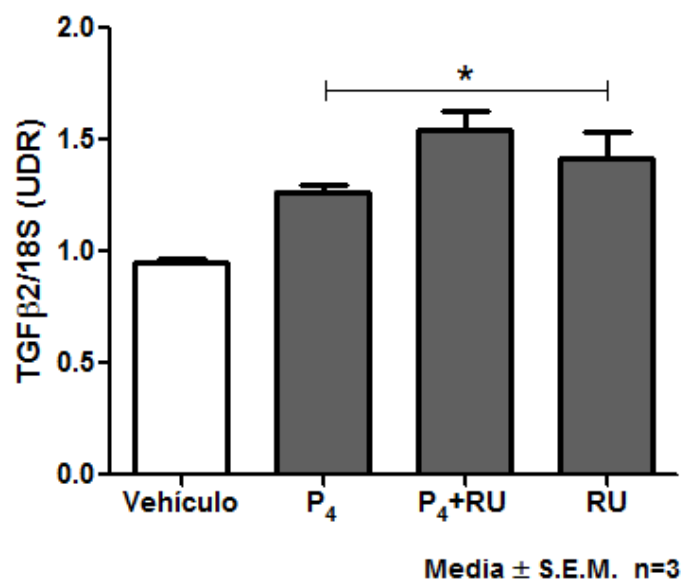
**Figura 14.** Niveles del mRNA de GLIPR2 determinados por RT-PCR (3  $\mu$ g de RNA total) en la línea celular U373 a las 12 h de tratamiento con vehículo, P<sub>4</sub>, P<sub>4</sub>+RU y RU. A) Imagen representativa de los productos de amplificación en un gel de agarosa al 2%. Se presentan dos bandas, una de 157 pb que corresponde a la amplificación del mRNA del gen de GLIPR2 y una segunda de 219 pb que corresponde al RNA ribosomal 18S utilizado para normalizar los niveles de expresión de GLIPR2. B) Análisis densitométrico de la expresión relativa de GLIPR2 debida a los distintos tratamientos. Los resultados se expresan como media  $\pm$  S.E.M. \* P < 0.05 vs. V y P<sub>4</sub>. RU: RU486.



A)



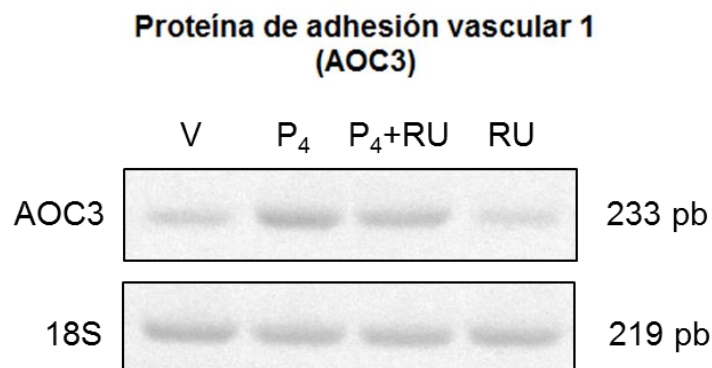
B)



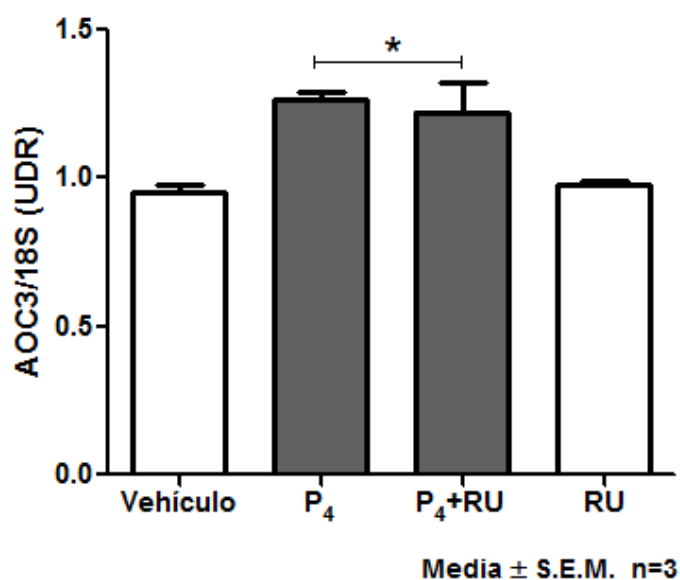
**Figura 15.** Niveles del mRNA de TGF $\beta$ 2 determinados por RT-PCR (3  $\mu$ g de RNA total) en la línea celular U373 a las 12 h de tratamiento con vehículo, P<sub>4</sub>, P<sub>4</sub>+RU y RU. A) Imagen representativa de los productos de amplificación en un gel de agarosa al 2%. Se presentan dos filas de bandas, una de 199 pb que corresponde a la amplificación del mRNA del gen de TGF $\beta$ 2 y una segunda fila de bandas de 219 pb que corresponde a su respectivo gen control, el RNA ribosomal 18S utilizado para normalización. B) Análisis densitométrico de la expresión relativa de TGF $\beta$ 2 debida a los distintos tratamientos. Los resultados se expresan como media  $\pm$  S.E.M. \* P < 0.05 vs. V. RU: RU486.

La expresión del gen AOC3, como en el caso de los genes anteriores, también muestra un aumento significativo con el tratamiento de P<sub>4</sub>+RU, además de un aumento con P<sub>4</sub>, mientras que el RU486 solo no tiene efecto alguno (Figura 16).

A)



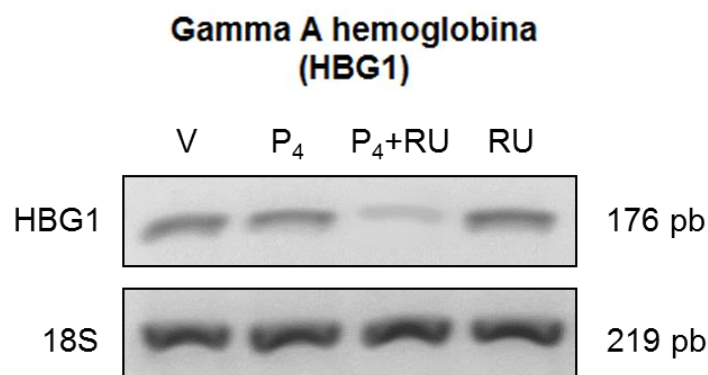
B)



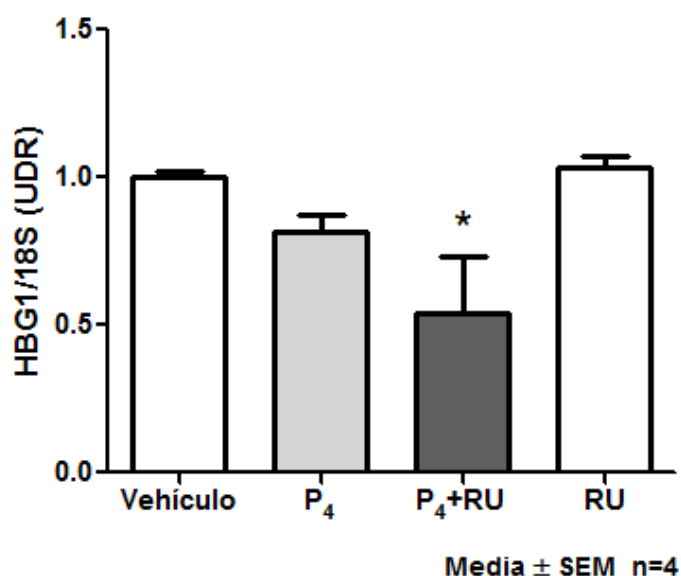
**Figura 16.** Niveles del mRNA de AOC3 determinados por RT-PCR (3 µg de RNA total) en la línea celular U373 a las 12 h de tratamiento con vehículo, P<sub>4</sub>, P<sub>4</sub>+RU y RU. A) Imagen representativa de los productos de amplificación en un gel de agarosa al 2%. Se presentan dos filas de bandas, una de 233 pb que corresponde a la amplificación del mRNA del gen de AOC3 y una segunda fila de bandas de 219 pb que corresponde al RNA ribosomal 18S utilizado para normalizar los niveles de expresión de AOC3. B) Análisis densitométrico de la expresión relativa de AOC3 debida a los distintos tratamientos. Los resultados se expresan como media ± S.E.M. \* P < 0.05 vs. V y RU486. RU: RU486.

En el caso del mRNA de HBG1, los niveles disminuyeron significativamente con el tratamiento conjunto de P<sub>4</sub>+RU, pero sólo se observó una tendencia de disminución cuando se administró P<sub>4</sub> sola (Figura 17).

A)



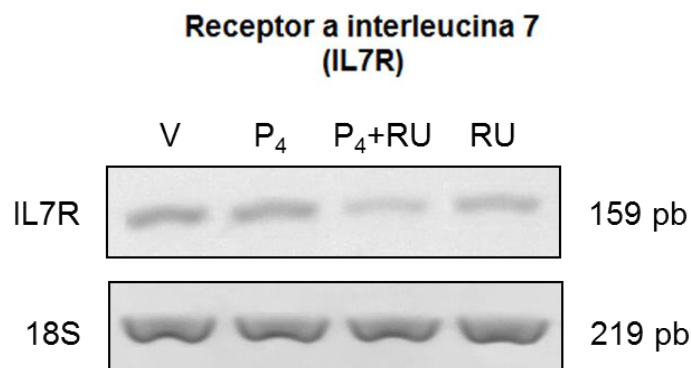
B)



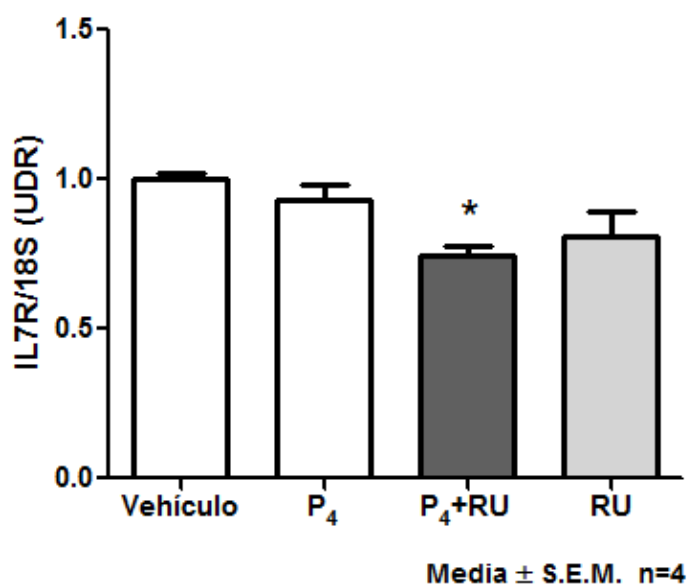
**Figura 17.** Niveles del mRNA de HBG1 determinados por RT-PCR (3 µg de RNA total) en la línea celular U373 a las 12 h de tratamiento con vehículo, P<sub>4</sub>, P<sub>4</sub>+RU y RU. A) Imagen representativa de los productos de amplificación en un gel de agarosa al 2%. Se presentan dos filas de bandas, una de 176 pb que corresponde a la amplificación del mRNA del gen de HBG1 y una segunda fila de bandas de 219 pb que corresponde a su respectivo gen control, el RNA ribosomal 18S utilizado para normalización. B) Análisis densitométrico de la expresión relativa de HBG1 debida a los distintos tratamientos. Los resultados se expresan como media ± S.E.M. \* P < 0.05 comparado con vs. V. RU: RU486.

Respecto a IL7R, un gen que codifica una proteína relacionada con citocinas, se determinó que la P<sub>4</sub> no regula su expresión a las 12h, sin embargo, la P<sub>4</sub> en conjunto con RU486 disminuyó significativamente su expresión, además de presentar una tendencia a la disminución con RU486 (Figura 18).

A)



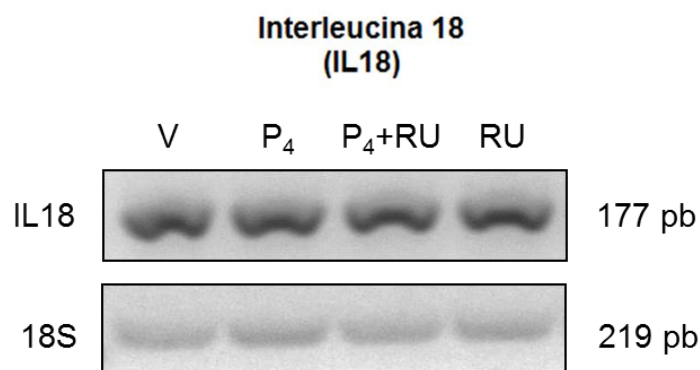
B)



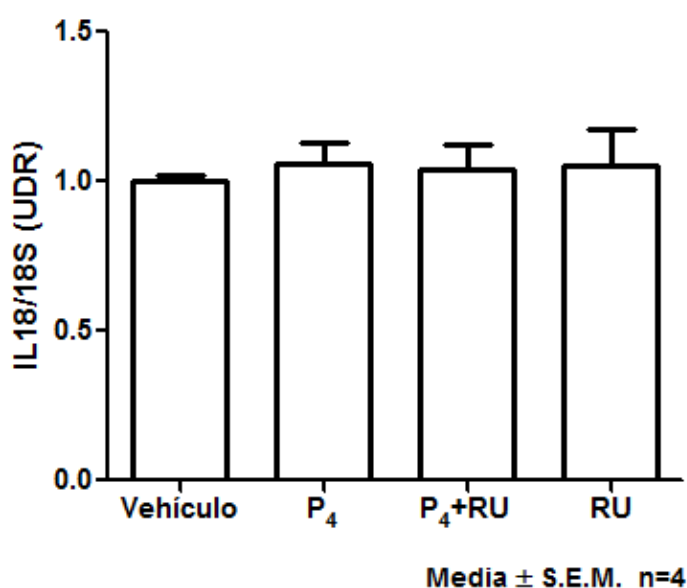
**Figura 18.** Niveles del mRNA de IL7R determinados por RT-PCR (3  $\mu$ g de RNA total) en la línea celular U373 a las 12 h de tratamiento con vehículo, P<sub>4</sub>, P<sub>4</sub>+RU y RU. A) Imagen representativa de los productos de amplificación en un gel de agarosa al 2%. Se presentan dos filas de bandas, una de 159 pb que corresponde a la amplificación del mRNA del gen de IL7R y una segunda fila de bandas de 219 pb que corresponde al RNA ribosomal 18S utilizado para normalizar los niveles de expresión de IL7R. B) Análisis densitométrico de la expresión relativa de IL7R debida a los distintos tratamientos. Los resultados se expresan como media  $\pm$  S.E.M. \* P < 0.05 vs. V. RU: RU486.

Se determinó también la expresión de IL18 y se encontró que en esta línea celular no se modifica su expresión después de 12 h de haber administrado los distintos tratamientos (Figura 19).

A)



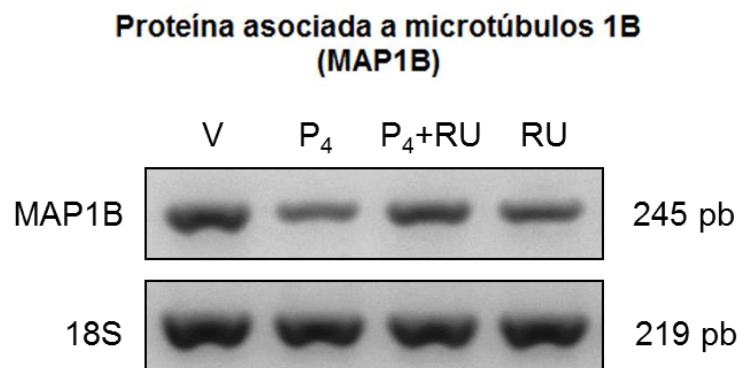
B)



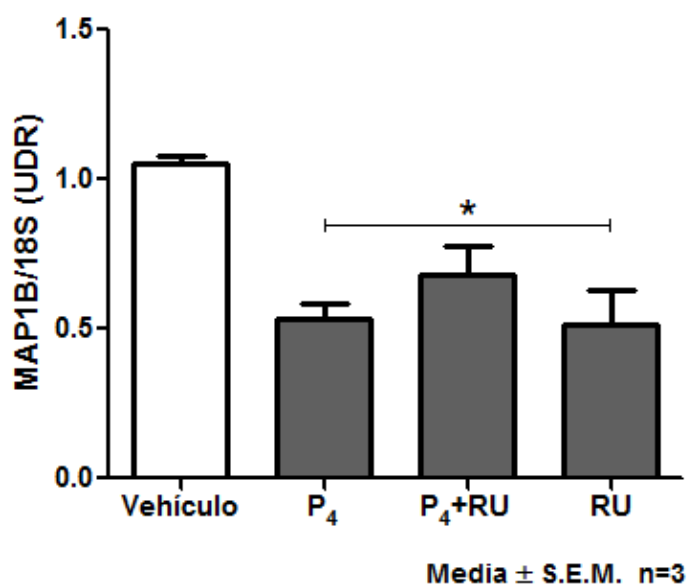
**Figura 19.** Niveles del mRNA de IL18 determinados por RT-PCR (3 µg de RNA total) en la línea celular U373 a las 12 h de tratamiento con vehículo, P<sub>4</sub>, P<sub>4</sub>+RU y RU. A) Imagen representativa de los productos de amplificación en un gel de agarosa al 2%. Se presentan dos filas de bandas, una de 177 pb que corresponde a la amplificación del mRNA del gen de IL18 y una segunda fila de bandas de 219 pb que corresponde a su respectivo gen control, el RNA ribosomal 18S utilizado para normalización. B) Análisis densitométrico de la expresión relativa de IL18 debida a los distintos tratamientos. Los resultados se expresan como media ± S.E.M. RU: RU486.

Los niveles de expresión de dos genes relacionados con citoesqueleto también fueron determinados. Uno de ellos es MAP1B para el cual se vio que todos los tratamientos disminuyen su expresión (Figura 20).

A)



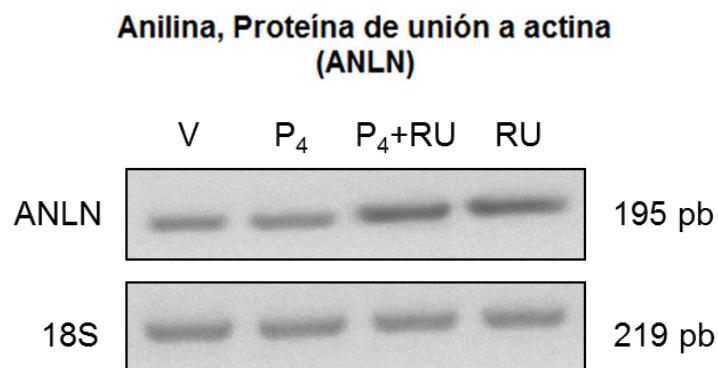
B)



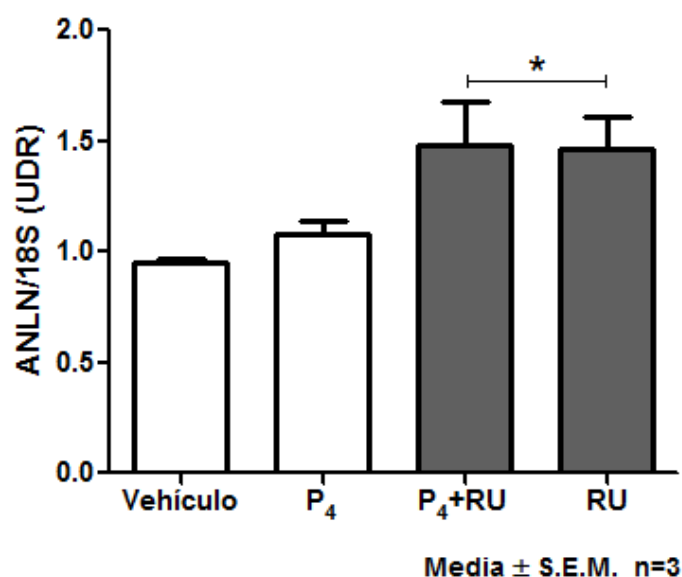
**Figura 20.** Niveles del mRNA de MAP1B determinados por RT-PCR (3 µg de RNA total) en la línea celular U373 a las 12 h de tratamiento con vehículo, P<sub>4</sub>, P<sub>4</sub>+RU y RU. A) Imagen representativa de los productos de amplificación en un gel de agarosa al 2%. Se presentan dos filas de bandas, una de 245 pb que corresponde a la amplificación del mRNA del gen de MAP1B y una segunda fila de bandas de 219 pb que corresponde al RNA ribosomal 18S utilizado para normalizar los niveles de expresión de MAP1B. B) Análisis densitométrico de la expresión relativa de MAP1B debida a los distintos tratamientos sobre la expresión del mRNA de MAP1B. Los resultados se expresan como media ± S.E.M. \* P < 0.05 vs. V. RU: RU486.

El segundo gen relacionado con citoesqueleto, ANLN, muestra un comportamiento similar a GLIPR2, ya que se observa una regulación positiva por RU486, ya sea administrado solo o en combinación con P<sub>4</sub>, mientras que con P<sub>4</sub> no se obtuvieron cambios significativos en su expresión (Figura 21).

A)



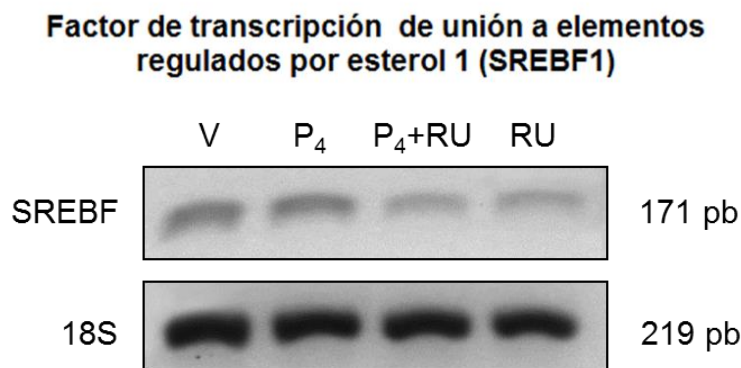
B)



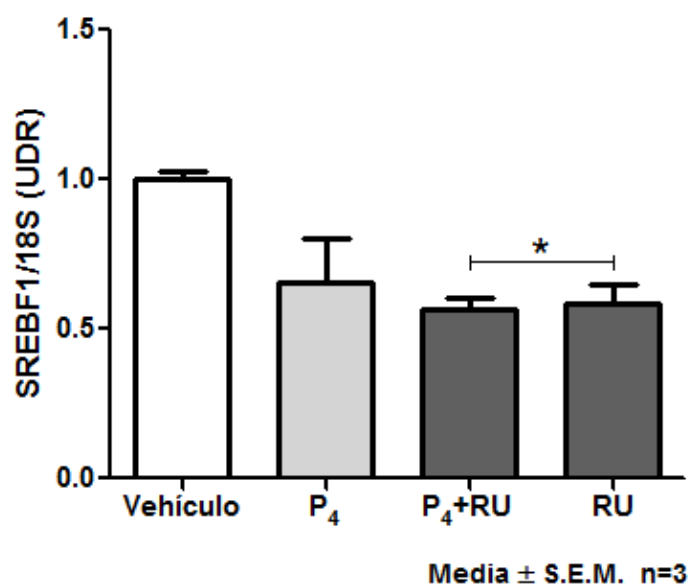
**Figura 21.** Niveles del mRNA de ANLN determinados por RT-PCR (3  $\mu$ g de RNA total) en la línea celular U373 a las 12 h de tratamiento con vehículo, P<sub>4</sub>, P<sub>4</sub>+RU y RU. A) Imagen representativa de los productos de amplificación en un gel de agarosa al 2%. Se presentan dos filas de bandas, una de 195 pb que corresponde a la amplificación del mRNA del gen de ANLN y una segunda fila de bandas de 219 pb que corresponde a su respectivo gen control, el RNA ribosómico 18S utilizado para normalización. B) Análisis densitométrico de la expresión relativa de ANLN debida a los distintos tratamientos. Los resultados se expresan como media  $\pm$  S.E.M. \* P < 0.05 vs. V. RU: RU486.

Finalmente se estudiaron dos genes relacionados con esteroides. SREBF1 es uno de ellos y se muestra que después de 12 h de tratamiento con P<sub>4</sub>, ésta no regula su expresión, aunque existe una tendencia de disminución, sin embargo, el RU486 sí la disminuye significativamente administrado tanto solo como en conjunto con P<sub>4</sub> (Figura 22).

A)



B)



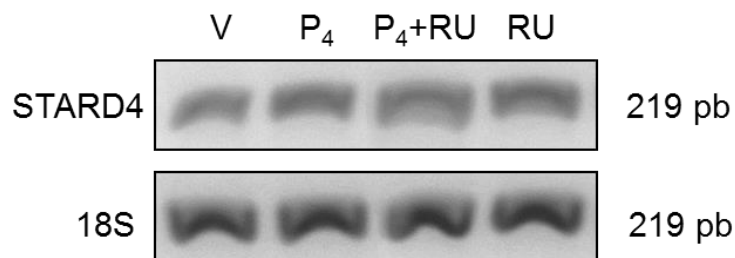
**Figura 22.** Niveles del mRNA de SREBF1 determinados por RT-PCR (3 µg de RNA total) en la línea celular U373 a las 12 h de tratamiento con vehículo, P<sub>4</sub>, P<sub>4</sub>+RU y RU. A) Imagen representativa de los productos de amplificación en un gel de agarosa al 2%. Se presentan dos filas de bandas, una de 245 pb que corresponde a la amplificación del mRNA del gen de SREBF1 y una segunda fila de bandas de 219 pb que corresponde al RNA ribosomal 18S utilizado para normalizar los niveles de expresión de SREBF1. B) Análisis densitométrico de la expresión relativa de SREBF1 debida a los distintos tratamientos. Los resultados se expresan como media ± S.E.M. \* P < 0.05 vs. V. RU: RU486.

STARD4, el cual está relacionado con esteroides, fue el último gen estudiado y para éste se observa, que la P<sub>4</sub> no modifica su expresión, mientras que el tratamiento combinado de P<sub>4</sub>+RU la incrementa significativamente (Figura 23).

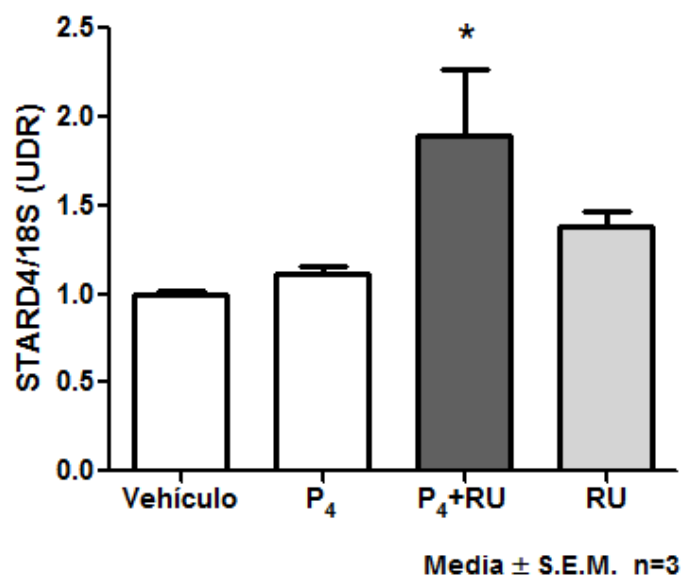


A)

**Proteína 4 que contiene el dominio de transferencia de lípidos relacionada a STAR (STARD4)**



B)



**Figura 23.** Niveles del mRNA de STARD4 determinados por RT-PCR (3  $\mu$ g de RNA total) en la línea celular U373 a las 12 h de tratamiento con vehículo, P<sub>4</sub>, P<sub>4</sub>+RU y RU. A) Imagen representativa de los productos de amplificación en un gel de agarosa al 2%. Se presentan dos filas de bandas, una de 195 pb que corresponde a la amplificación del mRNA del gen de STARD4 y una segunda fila de bandas de 219 pb que corresponde a su respectivo gen control, el RNA ribosomal 18S utilizado para normalización. B) Análisis densitométrico de la expresión relativa de STARD4 debida a los distintos tratamientos. Los resultados se expresan como media  $\pm$  S.E.M. \* P < 0.05 vs. V y P<sub>4</sub>. RU: RU486.

Los efectos de los distintos tratamientos observados mediante el ensayo de microarreglos y por RT-PCR sobre la expresión de los genes elegidos para validación son resumidos en la siguiente tabla (Tabla 5).

**Tabla 5.** Efectos de los tratamientos sobre los niveles del mRNA de los genes utilizados para confirmación de los resultados obtenidos con microarreglos en la línea celular U373.

| Gen    | Microarreglo     |                    |                  | RT-PCR           |                    |                  |
|--------|------------------|--------------------|------------------|------------------|--------------------|------------------|
|        | P <sub>4</sub>   | P <sub>4</sub> +RU | RU               | P <sub>4</sub>   | P <sub>4</sub> +RU | RU               |
| GLIPR2 | -                | Aumenta<br>1.6     | Aumenta<br>1.5   | -                | Aumenta<br>1.4     | Aumenta<br>1.3   |
| TGFβ2  | -                | Aumenta<br>1.5     | -                | Aumenta<br>1.3   | Aumenta<br>1.6     | Aumenta<br>1.5   |
| AOC3   | Aumenta<br>1.5   | -                  | -                | Aumenta<br>1.3   | Aumenta<br>1.3     | -                |
| HBG1   | Aumenta<br>2.7   | -                  | Aumenta<br>3.2   | -                | Disminuye<br>1.5   | -                |
| IL7R   | -                | Disminuye<br>1.5   | -                | -                | Disminuye<br>1.3   | -                |
| IL18   | Disminuye<br>1.5 | -                  | -                | -                | -                  | -                |
| MAP1B  | -                | Disminuye<br>1.5   | -                | Disminuye<br>1.5 | Disminuye<br>1.4   | Disminuye<br>1.5 |
| ANLN   | -                | Disminuye<br>1.9   | -                | -                | Aumenta<br>1.5     | Aumenta<br>1.5   |
| SREBF1 | -                | -                  | Disminuye<br>1.5 | -                | Disminuye<br>1.4   | Disminuye<br>1.4 |
| STARD4 | -                | Disminuye<br>1.7   | Disminuye<br>1.6 | -                | Aumenta<br>1.9     | -                |

Los números que no se expresan en porcentaje indican las veces de cambio.

En esta tabla se observa que hay genes como GLIPR2 cuya expresión coincide totalmente entre la determinación realizada por microarreglos y por RT-PCR.

Además, se muestra que en varios casos como TGFβ2, AOC3 o MAP1B, el cambio estadísticamente significativo de la expresión de un gen a causa de cierto tratamiento, se observó tanto por microarreglos como por RT-PCR, sin embargo, mediante la validación se encontraron además cambios significativos debido a otro u otros de los tratamientos. En otros casos como IL18 o ANLN, los resultados que coincidieron entre los dos métodos ocurrieron con tratamientos que no alteraron la expresión, y de la misma forma que se mencionó anteriormente, se encontraron cambios extras mediante RT-PCR.

Por otro lado, existió solamente un gen, HBG1, en donde no hubo correlación entre los resultados obtenidos por las dos técnicas en ningún tratamiento.

## 9. DISCUSIÓN

Las hormonas esteroides como la  $P_4$  regulan muchos procesos biológicos que no se limitan a órganos y tejidos reproductivos (Inoue *et al.*, 2002), además de que pueden participar en procesos patológicos como la tumorigénesis (Camacho-Arroyo *et al.*, 2000). Varias funciones de la  $P_4$  son mediadas a través de la unión con sus receptores intracelulares (Henley *et al.* 2005), los cuales, mediante la activación de vías de señalización o la regulación de la transcripción pueden aumentar o disminuir la expresión de genes blanco (Boonyaratanakornkit *et al.*, 2008; Misiti *et al.*, 1998).

Entre los tipos de tumores malignos de los cuales se ha propuesto que las hormonas esteroides pueden participar en la regulación de su desarrollo y crecimiento, se encuentran los astrocitomas (Kabat *et al.*, 2010; González-Agüero *et al.*, 2007), los cuales constituyen más de un tercio de los tumores cerebrales primarios, son los más agresivos del SNC y resultan en gran parte de alteraciones genéticas y de una desregulada expresión de genes (Zhou, *et al.*, 2003). Se ha reportado que la  $P_4$  participa en el desarrollo y crecimiento de los astrocitomas y que los efectos de esta hormona pueden estar mediados por el RP (Cabrera-Muñoz *et al.*, 2009; González-Agüero *et al.*, 2001). En cuanto a esto, estudios recientes demostraron que la  $P_4$ , a través del RP, regula la expresión de ciclina D1 en astrocitomas grado III y de VEGF y EGFR en astrocitomas grado IV (Hernández-Hernández *et al.*, 2012). Ya que en este tipo de tumores se desconocen la gran mayoría de los genes cuya expresión puede ser alterada con  $P_4$ , en el presente trabajo se estudió el efecto de esta hormona y de su antagonista RU486 sobre el patrón de la expresión génica en la línea celular derivada de astrocitomas humanos grado III, U373, mediante la técnica de microarreglos y la validación por RT-PCR.

Los resultados obtenidos mediante microarreglos muestran que la  $P_4$  a las 12 h regula, ya sea positiva o negativamente, la expresión de distintos genes, muchos de los cuales participan en procesos inmunológicos, de proliferación, adhesión y metabólicos (Tablas 3 y 6) y pudieran tener una participación importante en el

desarrollo de la patología. Esto concuerda con el hecho de que los gliomas, al igual que el cáncer en general, tienen un proceso complejo en donde la expresión de diversas moléculas se modifica para permitir que las células tumorales tengan un suministro suficiente de oxígeno y nutrientes, no sean afectadas por el sistema inmune y tengan la capacidad de migrar e invadir (Kareva y Hahnfeldt, 2013; Nakada *et al.*, 2007; Friedl y Wolf, 2003). Entre los genes que se encontró con microarreglos que su expresión es alterada por la hormona, aparecen varios cuya alteración ya se ha visto con  $P_4$  en otros tipos de cáncer y/o en otras condiciones patológicas (Paulssen *et al.*, 2008; Lapp *et al.*, 1995; Fan *et al.*, 2013), sin embargo, se observan muchos para los cuales no se ha reportado que su presencia o administración pueda modificar sus niveles de mRNA.

A través de los microarreglos se encontraron distintos genes también regulados por  $P_4$  y que se expresan diferencialmente en comparación con los distintos tratamientos, pero que tienen como producto RNAs no codificantes (Tablas 6, 9 y 10 de Anexo 2). Esto, aunque para fines prácticos del presente trabajo no fueron tomados en cuenta en el proceso de validación, resulta interesante ya que se sabe que este tipo de moléculas tienen el potencial de regular la expresión de genes a diferentes niveles lo que abre un campo más de estudio para poder entender los procesos alterados en estas células.

En los mapas de calor se observaron bloques de genes ya sean regulados a la baja o a la alta y fue posible notar que los arreglos se agruparon por tratamiento, lo cual indica que éstos fueron aplicados de manera correcta en experimentos independientes. Sin embargo, a pesar de que los microarreglos son una herramienta cada vez más utilizada que brinda información muy valiosa y permite determinar de forma comparativa perfiles de expresión génica a gran escala, es decir, se detectan simultáneamente la expresión de cientos o miles de genes, sus resultados deben considerarse con reserva y deben ser validados con una metodología diferente debido principalmente a los falsos positivos que da la técnica (Miron *et al.*, 2006; Murphy, 2002).

En cuanto a la validación, como se mencionó anteriormente, de todos los genes que presentaron alteraciones en su expresión, para su confirmación se

eligieron diez que podrían resultar de interés biológico en el desarrollo y/o crecimiento de los tumores de acuerdo a la revisión general que se realizó (Tabla 4). De forma general, el proceso de validación consiste en repetir una medición a través de una aproximación o ensayo diferente. La metodología utilizada puede variar dependiendo del problema en cuestión, pero entre las técnicas que suelen utilizarse se encuentran algunas de las variantes o derivadas del PCR. Como ejemplo se tiene al RT-PCR, ya sea punto final o en tiempo real (qPCR), técnica que tiene como ventaja su alta sensibilidad y especificidad, además de ser relativamente rápida y de bajo costo y requerir una cantidad mínima de muestra inicial (Tan, 2006; Chuaqui *et al.*, 2002). Ambos tipos de RT-PCR han sido utilizados (Darwiche *et al.*, 2007; Jeanty *et al.*, 2010), sin embargo, aunque el qRT-PCR implica mayor costo, se ha convertido en el método estándar, ya que a diferencia del punto final, permite realizar la determinación de los niveles de mRNA de forma cuantitativa, con menor riesgo de contaminación y con mayor rapidez (Costa, 2004; Chuaqui *et al.*, 2002; Fraga *et al.*, 2008).

La técnica mediante la cual se realizó el proceso de validación fue RT-PCR principalmente debido a su menor costo y los datos obtenidos muestran resultados interesantes. La alteración (o ausencia de esta) en la expresión de muchos de los genes elegidos, por ejemplo, AOC3 y MAP1B, fue confirmada que ocurre sólo a causa de alguno(s) de los tratamientos, pero no de todos los que indicó el microarreglo.

Existen varios factores que en conjunto pueden haber influido en que no haya una completa correlación entre las técnicas utilizadas. Entre éstos, está el hecho de que se ha reportado que en este tipo de microarreglos, para su fabricación se utilizan bases de datos de secuencias que son públicas, las cuales en ocasiones son ambiguas y pueden contener errores y como consecuencia, aunque las sondas sean diseñadas de forma muy específica, no es posible detectar de forma correcta el mRNA blanco (Murphy, 2002).

De forma muy importante, aunque los procedimientos para el tratamiento de los microarreglos mejoran constantemente, los métodos estadísticos para su análisis son diversos (en ocasiones hay falta de concordancia entre ellos) y no

existe uno que se haya estandarizado ni que se utilice de forma rutinaria, ya que, en general, la estadística ha lidiado siempre con muestras que tienen un número muy limitado de variables y no, como en los microarreglos, en donde hay un número muy limitado de muestras y un gran número de variables; esto en definitiva influye y afecta a los datos obtenidos. El análisis estadístico es probablemente la parte más difícil de la técnica y en la que se llegan a tener más problemas, ya que se debe extraer información de miles de datos de los cuales muchos de ellos son considerados como ruido de fondo. Esto es otros de los factores, además de los falsos positivos inherentes a la técnica, por los cuales se debe utilizar una técnica independiente para confirmar los resultados obtenidos (Miron *et al.*, 2006; Murphy, 2002).

Ahora, hay que considerar también que, aunque los resultados obtenidos por RT-PCR tienen mayor validez sobre los microarreglos ya que permiten determinar de una forma más directa las diferencias en los niveles de expresión de genes, la técnica que fue utilizada para validación es solamente semicuantitativa y tiene una menor sensibilidad que la del qRT-PCR (Smith y Osborn, 2009 y Ben *et al.*, 2011) lo que pudiera implicar algunos errores de interpretación y limitar en algunos casos la detección de los cambios en la expresión. Esto, además, contribuye también de cierta manera a que los datos obtenidos por las diferentes técnicas experimentales muestren solamente correlación parcial.

Por otro lado, no todo resultó en poca o falta de correlación entre las técnicas; el microarreglo y el RT-PCR mostraron los mismos cambios en la expresión de dos genes con los tratamientos (Tabla 5). GLIPR2 e IL7R resultaron ser genes que independientemente de la técnica utilizada para su estudio mostraron el mismo tipo de cambio en su expresión con los mismos tratamientos. La consistencia de la alteración en sus niveles de mRNA los hace de interés y permite una mayor confianza al continuar con su estudio. Pudiera también pensarse en que al estar presente el tratamiento, es de importancia que el gen en cuestión tenga modificada su expresión para que el tratamiento pueda tener su efecto general.

Aunque GLIPR2 codifica para una proteína poco estudiada aún y de la cual su función no está bien caracterizada (Baxter *et al.*, 2007), se ha encontrado en muchas líneas celulares de glioma (Groves *et al.*, 2004) y estudios *in vitro* muestran que puede inducir la transición epitelio mesénquima la cual es esencial en la plasticidad celular durante el desarrollo, pero que también se ha relacionado con la progresión en cáncer (Baxter *et al.*, 2007; De Craene y Berx, 2013). IL7R es un gen cuyo producto tiene un papel crítico en el desarrollo, diferenciación, crecimiento y activación de las células linfoides (Al-Rawi *et al.*, 2004) y ha sido relacionado con una disminución de la respuesta inmune encargada de evitar el desarrollo del tumor en gliomas de alto grado de evolución (Ardon *et al.*, 2010).

Entre los genes seleccionados se encontró el caso en donde los niveles de mRNA son alterados únicamente por  $P_4$ . Esto ocurrió específicamente con AOC3, que cataliza la oxidación de aminas a aldehídos y participa en procesos de extravasación y migración celular principalmente inducida por inflamación (Jalkanen y Salmi, 2007), pero cabe resaltar que esta regulación parece ser a través de un mecanismo no clásico ya que el efecto de la  $P_4$  no fue revertido o bloqueado por su administración en conjunto con el RU486. Podría incluso pensarse en la participación del RP de membrana. De hecho, aunque mucho tiempo se pensó que el principal mecanismo de acción de la  $P_4$  era el conocido como genómico, ahora se sabe que los mecanismos a través de los cuales la  $P_4$  ejerce sus efectos son diversos (Singh *et al.*, 2013).

De forma interesante, se observó para algunos genes que el RU486 y el tratamiento conjunto de  $P_4$ +RU regulan su expresión sin encontrarse efecto de la  $P_4$  sola. Este es el caso de GLIPR2, ANLN y SREBF1. Aquí resalta el hecho de que el RU486 sea el que causó un efecto y no la  $P_4$ ; ya que este compuesto es antagonista de la hormona se esperaría que por sí solo no alterara la expresión, sino hasta que estuviera presente la  $P_4$ . Parte de esto podría explicarse por el hecho de que el RU486 no se une exclusivamente al RP, ya que es también antagonista del receptor a glucocorticoides (afinidad similar que por el RP), el cual también puede modular la transcripción de genes por interacción directa con el DNA o de forma indirecta por interacción con otras moléculas como AP-1 o NF $\kappa$ B

(Raaijmakers *et al.*, 2009; Horner *et al.*, 2003). Además, se ha reportado que este compuesto no siempre actúa como antagonista. Hay estudios en líneas celulares de astrocitomas en los cuales la administración del RU486 solo disminuye significativamente la proliferación, además, mediante microarreglos se ha reportado la alteración de la expresión de genes debida a este antagonista en ratones hembra. También se ha visto que en adipocitos, la sola administración del RU486 aumenta la expresión de ciertas proteínas, mecanismo que podría involucrar al RP o al receptor a glucocorticoides (González-Agüero *et al.*, 2007; Rodríguez y Palou, 2004; Cheon *et al.*, 2002). En cuanto a esto, para determinar de forma específica qué genes son realmente regulados por el RP y descartar la posibilidad de que los resultados puedan ser debidos a la participación del receptor a glucocorticoides, sería conveniente utilizar un antagonista puro como la onapristona o silenciar la expresión de dicho receptor.

También se vio que sobre el mismo gen puede existir una combinación de los efectos antes mencionados, es decir que el RU486 tenga el mismo efecto que la  $P_4$  y que el tratamiento conjunto de  $P_4$ +RU486. Esto se observó en TGF $\beta$ 2 y MAP1B. Aquí, ya que no se observa un efecto sinérgico, es posible que estos compuestos actúen a través del mismo mecanismo para causar un mismo efecto, sin embargo, los estudios acerca del mecanismo de acción del RU486 como agonista son muy escasos.

TGF $\beta$ 2 resulta también interesante para continuar con su estudio, principalmente enfocado al mecanismo de acción debido a que se presenta el efecto de que tanto la  $P_4$  como su antagonista aumentan el contenido de su mRNA, aparte de que este gen se ha visto implicado en cáncer de mama (Buck y Knabbe, 2006) y en gliomas de alto grado de malignidad (Schneider *et al.*, 2006). Se sabe además que el RP activado por su ligando puede unirse directamente al DNA para la regulación de la transcripción de genes blanco de la  $P_4$  que presentan ERP en su secuencia promotora, o puede unirse indirectamente al DNA mediante su asociación con otros factores de transcripción como AP-1 y se ha sugerido que el promotor de TGF $\beta$ 2 está sujeto a control hormonal debido a que posee un sitio



CRE-ATF y tiene alta homología con TGF $\beta$ -1, el cual presenta sitios de unión a AP-1 (Jacobsen *et al.*, 2005; Govinden y Bhoola, 2003).

De igual forma, en varios genes seleccionados se vio que respondieron únicamente cuando se les administró P<sub>4</sub>+RU486. Así se observó con HBG1, IL7R y STARD4. Aquí sí pudiera pensarse en un efecto de suma o sinérgico de los compuestos de forma que, administrados como tratamiento único, alteran la expresión en muy pequeña medida, pero al administrarse en conjunto, ya alcanzan a cambiar los niveles de forma significativa.

Como es posible darse cuenta, se encontraron varios efectos interesantes de los tratamientos sobre los niveles de expresión de los genes utilizados en el proceso de validación. Resultaría interesante estudiar los mecanismos involucrados en los cambios de expresión observados, ya que es claro que, además de que en algunos casos la regulación por P<sub>4</sub> podría ocurrir de la forma clásica, también podría participar a través de otros mecanismos. Asimismo, el RU486 también resultó tener una participación importante y no existen muchos estudios acerca de esto, ya que principalmente los mecanismos de acción de este compuesto se han enfocado en su papel como antagonista.

Otra cosa que vale la pena resaltar, es que para muchos de los genes estudiados en este trabajo, especialmente de los seleccionados para validación, no se tiene nada reportado acerca de que pudieran ser regulados por P<sub>4</sub>, y menos por RU486, ni en condiciones fisiológicas ni patológicas. Como ejemplo de estos, se tiene a GLIPR2, IL7R y ANLN. Para algunos otros hay reportes que sugieren alguna relación entre el gen o sus productos y la P<sub>4</sub>, por ejemplo, para TGF $\beta$ 2 (Burney *et al.*, 2007), sin embargo, para la mayoría no hay suficientes estudios. Así pues, se puede sugerir que varios de los genes seleccionados tienen la posibilidad de ser nuevos marcadores en estos tumores y es recomendable incluirlos en más estudios, ya que además de modificarse con los tratamientos.

Es importante mencionar además que, aunque los controles y agrupamiento de los datos de los microarreglos resultaron como se esperaba, valdría la pena enriquecer los resultados con uno o dos ensayo más, ya que, como en todo experimento en donde se requiere hacer estadística, se debe incluir suficiente

número de experimentos independientes (como en el caso de la validación, en donde mínimo fueron 3 experimentos) para permitir una mejor evaluación de los datos (Murphy, 2002).

También, a pesar de que la tasa de cambio para cada uno de los genes que presentaron cambios significativos, tanto por microarreglos como por RT-PCR, debido a los distintos tratamientos no fue tan grande como se esperaba, no se debe descartar un papel realmente importante de estos genes ya que es posible que el nivel de mRNA no refleje el estado funcional final de la proteína (Murphy, 2002). Existen casos en donde mediante proteómica se analizaron muestras de glioblastomas y se encontraron altos niveles de la proteína de PDGF, pero no tan altos de mRNA, lo que indica que es posible que basándose únicamente en estudios a nivel de mensajero, podrían subestimarse ciertos genes (Dunn *et al.*, 2012). Es por esto que, de forma independiente a una validación y como perspectiva, para algunos de los genes estudiados en este trabajo se ha pensado en determinar el contenido de proteína.

Finalmente, podría considerarse la realización de más ensayos de este tipo en esta misma línea celular, pero a otros tiempos (Hernández-Hernández *et al.*, 2012). También podrían realizarse en una línea celular de glioblastoma como la D54, ya que es en este grado de malignidad en donde se tienen los mayores estudios y se da una mayor desregulación de la expresión de genes.

## 10. CONCLUSIONES

- La  $P_4$  participa en la regulación del patrón de expresión génica, regulación que también es afectada por el RU486, en la línea celular U373 derivada de astrocitomas humanos.
- El efecto de la  $P_4$  sobre la regulación de genes puede estar no sólo mediada a través del RP, sino a través de diferentes mecanismos de acción.

## 11. REFERENCIAS

- Aalberts M, van Dissel-Emiliani FM, van Adrichem NP, van Wijnen M, Wauben MH, Stout TA, Stoorvogel W (2012) Identification of distinct populations of prostasomes that differentially express prostate stem cell antigen, annexin A1, and GLIPR2 in humans. *Biol Reprod* 86:82
- Agnihotri S, Burrell KE, Wolf A, Jalali S, Hawkins C, Rutka JT, Zadeh G (2013) Glioblastoma, a brief review of history, molecular genetics, animal models and novel therapeutic strategies. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis* 61:25-41
- Ahmed EI, Zehr JL, Schulz KM, Lorenz BH, DonCarlos LL, Sisk CL (2008) Pubertal hormones modulate the addition of new cells to sexually dimorphic brain regions. *Nature neuroscience* 11:995-997
- Al-Rawi MA, Rmali K, Watkins G, Mansel RE, Jiang WG (2004) Aberrant expression of interleukin-7 (IL-7) and its signalling complex in human breast cancer. *Eur J Cancer* 40:494-502
- Alenzi FQ (2004) Links between apoptosis, proliferation and the cell cycle. *British journal of biomedical science* 61:99-102
- Anand P, Kunnumakkara AB, Sundaram C, Harikumar KB, Tharakan ST, Lai OS, Sung B, Aggarwal BB (2008) Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. *Pharm Res* 25:2097-2116
- Angel MG, Angel RM (2006) Interpretación clínica del laboratorio, 7a. edición edn. Editorial Médica Panamericana, Bogotá
- Ardon H, Verbinnen B, Maes W, Beez T, Van Gool S, De Vleeschouwer S (2010) Technical advancement in regulatory T cell isolation and characterization using CD127 expression in patients with malignant glioma treated with autologous dendritic cell vaccination. *J Immunol Methods* 352:169-173
- Australia CC (2011) Adult gliomas (astrocytomas and oligodendrogliomas): A guide for patients, their families and carers. Clinical Oncological Society of Australia/Cancer Council Australia, Sydney
- Badash M (2009) Astrocitoma. New York University Medical Center, New York, pp 1-4
- Baeck M, Marot L, Nicolas JF, Pilette C, Tennstedt D, Goossens A (2009) Allergic hypersensitivity to topical and systemic corticosteroids: a review. *Allergy* 64:978-994
- Batchelor T, Supko JG (2013) Experimental treatment approaches for malignant gliomas. In: R. BD (ed) *UpToDate*, Waltham
- Baulieu EE (1999) Neuroactive neurosteroids: dehydroepiandrosterone (DHEA) and DHEA sulphate. *Acta Paediatr Suppl* 88:78-80
- Baxter RM, Crowell TP, George JA, Getman ME, Gardner H (2007) The plant pathogenesis related protein GLIPR-2 is highly expressed in fibrotic kidney and promotes epithelial to mesenchymal transition in vitro. *Matrix Biol* 26:20-29
- Ben Abda I, de Monbrison F, Bousslimi N, Aoun K, Bouratbine A, Picot S (2011) Advantages and limits of real-time PCR assay and PCR-restriction fragment length polymorphism for the identification of cutaneous *Leishmania* species in

- Tunisia. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 105:17-22
- Bolstad BM, Irizarry RA, Astrand M, Speed TP (2003) A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. *Bioinformatics* 19:185-193
- 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* 73:922-928
- Bramley T (2003) Non-genomic progesterone receptors in the mammalian ovary: some unresolved issues. *Reproduction* 125:3-15
- Bristol RE (2009) Low-grade glial tumors: are they all the same? *Semin Pediatr Neurol* 16:23-26
- Buck MB, Knabbe C (2006) TGF-beta signaling in breast cancer. *Ann N Y Acad Sci* 1089:119-126
- Buckner JC, Brown PD, O'Neill BP, Meyer FB, Wetmore CJ, Uhm JH (2007) Central nervous system tumors. *Mayo Clin Proc* 82:1271-1286
- Burney RO, Talbi S, Hamilton AE, Vo KC, Nyegaard M, Nezhat CR, Lessey BA, Giudice LC (2007) Gene expression analysis of endometrium reveals progesterone resistance and candidate susceptibility genes in women with endometriosis. *Endocrinology* 148:3814-3826
- Cabrera-Munoz E, Gonzalez-Arenas A, Saqui-Salces M, Camacho J, Larrea F, Garcia-Becerra R, Camacho-Arroyo I (2009) Regulation of progesterone receptor isoforms content in human astrocytoma cell lines. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 113:80-84
- Cabrera-Munoz E, Hernandez-Hernandez OT, Camacho-Arroyo I (2011) Role of progesterone in human astrocytomas growth. *Curr Top Med Chem* 11:1663-1667
- Camacho-Arroyo I, Gonzalez-Aguero G, Gamboa-Dominguez A, Cerbon MA, Ondarza R (2000) Progesterone receptor isoforms expression pattern in human chordomas. *J Neurooncol* 49:1-7
- Camacho-Arroyo I, Gonzalez-Arenas A, Gonzalez-Aguero G, Guerra-Araiza C, Gonzalez-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* 136:447-452
- Camacho-Arroyo I, Gonzalez-Arenas A, Gonzalez-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* 146:644-652
- Camacho-Arroyo I, Montor JM (2012) Beyond reproductive effects of sex steroids. *Mini reviews in medicinal chemistry* 12:1037-1039
- Camacho-Arroyo I, Rodríguez-Dorantes M (2006) Transcriptional activity regulated by progesterone receptor isoforms. *Molecular endocrinology. Research Signpost, Kerala, India*, pp 25-38
- Carr B, Bradshaw K (2005) Enfermedades del ovario y del aparato reproductor femenino. In: Kasper D, Braunwald E, Fauci A, Hauser S, Longo D, Jameson J,

- Isselbacher K (eds) HARRISON, Principios de Medicina Interna, 16 edn. McGraw-Hill/Interamericana de México, México, pp 11566-11580
- Carroll CE, Liang Y, Benakanakere I, Besch-Williford C, Hyder SM (2013) The anticancer agent YC-1 suppresses progesterin-stimulated VEGF in breast cancer cells and arrests breast tumor development. *International journal of oncology* 42:179-187
- Carroll RS, Glowacka D, Dashner K, Black PM (1993) Progesterone receptor expression in meningiomas. *Cancer research* 53:1312-1316
- Carroll RS, Zhang J, Dashner K, Sar M, Black PM (1995) Steroid hormone receptors in astrocytic neoplasms. *Neurosurgery* 37:496-503; 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. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 53:487-495
- Costa J (2004) Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica* 22:7
- Chekhonin VP, Shein SA, Korchagina AA, Gurina OI (2013) VEGF in tumor progression and targeted therapy. *Current cancer drug targets* 13:423-443
- Cheon YP, Li Q, Xu X, DeMayo FJ, Bagchi IC, Bagchi MK (2002) A genomic approach to identify novel progesterone receptor regulated pathways in the uterus during implantation. *Molecular endocrinology* 16:2853-2871
- Cheuk DK, Chiang AK, Ha SY, Chan GC (2013) Malignancies in Chinese patients with neurofibromatosis type 1. *Hong Kong medical journal = Xianggang yi xue za zhi / Hong Kong Academy of Medicine* 19:42-49
- Chow AY (2010) Cell Cycle Control by Oncogenes and Tumor Suppressors: Driving the Transformation of Normal Cells into Cancerous Cells. *Nature Education* 3:7
- Chuaqui RF, Bonner RF, Best CJ, Gillespie JW, Flaig MJ, Hewitt SM, Phillips JL, Krizman DB, Tangrea MA, Ahram M, Linehan WM, Knezevic V, Emmert-Buck MR (2002) Post-analysis follow-up and validation of microarray experiments. *Nature genetics* 32 Suppl:509-514
- Dalman MR, Deeter A, Nimishakavi G, Duan ZH (2012) Fold change and p-value cutoffs significantly alter microarray interpretations. *BMC bioinformatics* 13 Suppl 2:S11
- Daniel AR, Knutson TP, Lange CA (2009) Signaling inputs to progesterone receptor gene regulation and promoter selectivity. *Molecular and cellular endocrinology* 308:47-52
- Darwiche N, Ryscavage A, Perez-Lorenzo R, Wright L, Bae DS, Hennings H, Yuspa SH, Glick AB (2007) Expression profile of skin papillomas with high cancer risk displays a unique genetic signature that clusters with squamous cell carcinomas and predicts risk for malignant conversion. *Oncogene* 26:6885-6895
- Daumas-Duport C, Scheithauer B, O'Fallon J, Kelly P (1988) Grading of astrocytomas. A simple and reproducible method. *Cancer* 62:2152-2165
- De Craene B, Berx G (2013) Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression. *Nature reviews Cancer* 13:97-110

- Dollinger M, Ko AH, Rosenbaum EH, Foster DA (2008) Understanding Cancer. In: Ko AH, Dollinger M, Rosenbaum EH (eds) Everyone's Guide to Cancer Therapy: How Cancer is Diagnosed, Treated and Managed Day to Day, 5a. edición edn. Andrews McMeel Publishing, Kansas City, pp 3-16
- Duffy MJ, McGowan PM, Gallagher WM (2008) Cancer invasion and metastasis: changing views. *The Journal of pathology* 214:283-293
- Dunn GP, Rinne ML, Wykosky J, Genovese G, Quayle SN, Dunn IF, Agarwalla PK, Chheda MG, Campos B, Wang A, Brennan C, Ligon KL, Furnari F, Cavenee WK, Depinho RA, Chin L, Hahn WC (2012) Emerging insights into the molecular and cellular basis of glioblastoma. *Genes & development* 26:756-784
- Edward A, Longo D (2005) Principios del tratamiento del cáncer: cirugía, quimioterapia y tratamiento biológico. In: Kasper D, Braunwald E, Fauci A, Hauser S, Longo D, Jameson J, Isselbacher K (eds) HARRISON, Principios de Medicina Interna, 16a. edición edn. McGraw-Hill/Interamericana de México, México, pp 2804-2820
- Ekblom J, Gronvall J, Lennernas B, Nilsson S, Garpenstrand H, Orelund L (1999) Elevated activity of semicarbazide-sensitive amine oxidase in blood from patients with skeletal metastases of prostate cancer. *Clin Sci (Lond)* 97:111-115
- Elmore S (2007) Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology* 35:495-516
- 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. *Molecular endocrinology* 22:823-837
- Faivre EJ, Lange CA (2007) Progesterone receptors upregulate Wnt-1 to induce epidermal growth factor receptor transactivation and c-Src-dependent sustained activation of Erk1/2 mitogen-activated protein kinase in breast cancer cells. *Molecular and cellular biology* 27:466-480
- Fan J, Shimizu Y, Chan J, Wilkinson A, Ito A, Tontonoz P, Dullaghan E, Galea LA, Pfeifer T, Wellington CL (2013) Hormonal modulators of glial ABCA1 and apoE levels. *Journal of lipid research* 54:3139-3150
- Forster-Horvath C, Dome B, Paku S, Ladanyi A, Somlai B, Jalkanen S, Timar J (2004) Loss of vascular adhesion protein-1 expression in intratumoral microvessels of human skin melanoma. *Melanoma Res* 14:135-140
- Fraga D, Meulia T, Fenster S (2008) Real-Time PCR. In: Gallagher SR, Wiley EA (eds) Current Protocols Essential Laboratory Techniques. John Wiley & Sons, Inc.
- Friedl P, Wolf K (2003) Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nature reviews Cancer* 3:362-374
- 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 & development* 21:2683-2710
- 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 progestin-induced mammary tumor growth by interacting with progesterone receptors at the cyclin D1/MYC promoters. *Cancer research* 72:2416-2427



- 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 research* 63:6613-6625
- Gonzalez-Aguero G, Gutierrez AA, Gonzalez-Espinosa D, Solano JD, Morales R, Gonzalez-Arenas A, Cabrera-Munoz E, Camacho-Arroyo I (2007) Progesterone effects on cell growth of U373 and D54 human astrocytoma cell lines. *Endocrine* 32:129-135
- Gonzalez-Aguero G, Ondarza R, Gamboa-Dominguez A, Cerbon MA, Camacho-Arroyo I (2001) Progesterone receptor isoforms expression pattern in human astrocytomas. *Brain Res Bull* 56:43-48
- Govinden R, Bhoola KD (2003) Genealogy, expression, and cellular function of transforming growth factor-beta. *Pharmacol Ther* 98:257-265
- Graham JD, Clarke CL (1997) Physiological action of progesterone in target tissues. *Endocr Rev* 18:502-519
- Groves MR, Kuhn A, Hendricks A, Radke S, Serrano RL, Helms JB, Sinning I (2004) Crystallization of a Golgi-associated PR-1-related protein (GAPR-1) that localizes to lipid-enriched microdomains. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 60:730-732
- Guerra-Araiza C, Camacho-Arroyo I (2000) [Progesterone receptor isoforms: function and regulation]. *Rev Invest Clin* 52:686-691
- Gupta MK, Chia S (2007) Ovarian Hormones: Structure, Biosynthesis, Function, Mechanism of Action, and Laboratory Diagnosis. In: Falcone T, Hurd WW (eds) *Clinical Reproductive Medicine and Surgery*, 1a. edn. MOSBY Elsevier, Hong Kong, pp 17-50
- Hadjipanayis CG, Van Meir EG (2009) Brain cancer propagating cells: biology, genetics and targeted therapies. *Trends Mol Med* 15:519-530
- Hanahan D, Weinberg RA (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144:646-674
- Hansberg-Pastor V, Gonzalez-Arenas A, Pena-Ortiz MA, Garcia-Gomez E, Rodriguez-Dorantes M, Camacho-Arroyo I (2013) The role of DNA methylation and histone acetylation in the regulation of progesterone receptor isoforms expression in human astrocytoma cell lines. *Steroids* 78:500-507
- Henley D, Lindzey J, Korach K (2005) Steroid Hormones. In: Melmed S, Conn P (eds) *Endocrinology*, 2 edn. Human Press, New Jersey, pp 46-65
- Hernandez-Hernandez OT, Gonzalez-Garcia TK, Camacho-Arroyo I (2012) Progesterone receptor and SRC-1 participate in the regulation of VEGF, EGFR and Cyclin D1 expression in human astrocytoma cell lines. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 132:127-134
- Honer C, Nam K, Fink C, Marshall P, Ksander G, Chatelain RE, Cornell W, Steele R, Schweitzer R, Schumacher C (2003) Glucocorticoid receptor antagonism by cyproterone acetate and RU486. *Mol Pharmacol* 63:1012-1020
- Horwitz KB, Sartorius CA, Hovland AR, Jackson TA, Groshong D, Tung L, Takimoto S (2007) Surprises with Antiprogestins: Novel Mechanisms of



- Progesterone Receptor Action. In: Bock GRGJA (ed) *Non-Reproductive Actions of Sex Steroids*. John Wiley & Sons, Chichester
- Huang K, Whelan EA, Ruder AM, Ward EM, Deddens JA, Davis-King KE, Carreon T, Waters MA, Butler MA, Calvert GM, Schulte PA, Zivkovich Z, Heineman EF, Mandel JS, Morton RF, Reding DJ, Rosenman KD, Brain Cancer Collaborative Study G (2004) Reproductive factors and risk of glioma in women. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 13:1583-1588
- 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* 70:137-160
- Inoue T, Akahira J, Suzuki T, Darnel AD, Kaneko C, Takahashi K, Hatori M, Shirane R, Kumabe T, Kurokawa Y, Satomi S, Sasano H (2002) Progesterone production and actions in the human central nervous system and neurogenic tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 87:5325-5331
- Jacobsen BM, Schittone SA, Richer JK, Horwitz KB (2005) Progesterone-independent effects of human progesterone receptors (PRs) in estrogen receptor-positive breast cancer: PR isoform-specific gene regulation and tumor biology. *Molecular endocrinology* 19:574-587
- Jalkanen S, Salmi M (2008) VAP-1 and CD73, endothelial cell surface enzymes in leukocyte extravasation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28:18-26
- Jeanty C, Longrois D, Mertes PM, Wagner DR, Devaux Y (2010) An optimized protocol for microarray validation by quantitative PCR using amplified amino allyl labeled RNA. *BMC genomics* 11:542
- Kabat GC, Etgen AM, Rohan TE (2010) Do steroid hormones play a role in the etiology of glioma? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 19:2421-2427
- Kareva I, Hahnfeldt P (2013) The emerging "hallmarks" of metabolic reprogramming and immune evasion: distinct or linked? *Cancer research* 73:2737-2742
- Kastner P, Krust A, Turcotte B, Stropp U, Tora L, Gronemeyer H, Chambon P (1990) Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B. *EMBO J* 9:1603-1614
- Khalid H, Shibata S, Kishikawa M, Yasunaga A, Iseki M, Hiura T (1997) Immunohistochemical analysis of progesterone receptor and Ki-67 labeling index in astrocytic tumors. *Cancer* 80:2133-2140
- Kieslich M, Schwabe D, Cinatl J, Jr., Driever PH (2003) Increase of fetal hemoglobin synthesis indicating differentiation induction in children receiving valproic acid. *Pediatr Hematol Oncol* 20:15-22
- Kim JJ, Chapman-Davis E (2010) Role of progesterone in endometrial cancer. *Seminars in reproductive medicine* 28:81-90
- Kim M, Park HJ, Seol JW, Jang JY, Cho YS, Kim KR, Choi Y, Lydon JP, Demayo FJ, Shibuya M, Ferrara N, Sung HK, Nagy A, Alitalo K, Koh GY (2013) VEGF-A

- regulated by progesterone governs uterine angiogenesis and vascular remodelling during pregnancy. *EMBO molecular medicine* 5:1415-1430
- Koper JW, Lamberts SW (1994) Meningiomas, epidermal growth factor and progesterone. *Human reproduction* 9 Suppl 1:190-194
- Kraus WL, Montano MM, Katzenellenbogen BS (1993) Cloning of the rat progesterone receptor gene 5'-region and identification of two functionally distinct promoters. *Molecular endocrinology* 7:1603-1616
- Labombarda F, Gonzalez S, Lima A, Roig P, Guennoun R, Schumacher M, De Nicola AF (2011) Progesterone attenuates astro- and microgliosis and enhances oligodendrocyte differentiation following spinal cord injury. *Experimental neurology* 231:135-146
- Lange CA, Yee D (2009) Progesterona y cáncer de mama. *Revista del climaterio* 12:153-156
- Lapp CA, Thomas ME, Lewis JB (1995) Modulation by progesterone of interleukin-6 production by gingival fibroblasts. *Journal of periodontology* 66:279-284
- Lebel-Binay S, Thiounn N, De Pinieux G, Vieillefond A, Debre B, Bonnefoy JY, Fridman WH, Pages F (2003) IL-18 is produced by prostate cancer cells and secreted in response to interferons. *International journal of cancer Journal international du cancer* 106:827-835
- Lee SY, Kim JW, Jeong MH, An JH, Jang SM, Song KH, Choi KH (2008) Microtubule-associated protein 1B light chain (MAP1B-LC1) negatively regulates the activity of tumor suppressor p53 in neuroblastoma cells. *FEBS Lett* 582:2826-2832
- 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. *Molecular endocrinology* 12:1914-1930
- Leonhardt SA, Edwards DP (2002) Mechanism of action of progesterone antagonists. *Exp Biol Med (Maywood)* 227:969-980
- Liang Y, Besch-Williford C, Brekken RA, Hyder SM (2007) Progestin-dependent progression of human breast tumor xenografts: a novel model for evaluating antitumor therapeutics. *Cancer research* 67:9929-9936
- 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* 146:3632-3641
- 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* 83:9045-9049
- Louis DN (2006) Molecular pathology of malignant gliomas. *Annual review of pathology* 1:97-117
- 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* 114:97-109
- Malkin D, Li FP, Strong LC, Fraumeni JF, Jr., Nelson CE, Kim DH, Kassel J, Gryka MA, Bischoff FZ, Tainsky MA, et al. (1990) Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science* 250:1233-1238

- McCarthy DJ, Smyth GK (2009) Testing significance relative to a fold-change threshold is a TREAT. *Bioinformatics* 25:765-771
- 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* 93:932-939
- Miller HM, Foxcroft GR, Squires J, Aherne FX (1999) The effects of feed intake and body fatness on progesterone metabolism in ovariectomized gilts. *J Anim Sci* 77:3253-3261
- Miron M, Woody OZ, Marcil A, Murie C, Sladek R, Nadon R (2006) A methodology for global validation of microarray experiments. *BMC Bioinformatics* 7:333
- Misiti S, Schomburg L, Yen PM, Chin WW (1998) Expression and hormonal regulation of coactivator and corepressor genes. *Endocrinology* 139:2493-2500
- Misrahi M, Venencie PY, Saugier-Veber P, Sar S, Dessen P, Milgrom E (1993) Structure of the human progesterone receptor gene. *Biochim Biophys Acta* 1216:289-292
- 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* 79:386-392
- Mulac-Jericevic B, Conneely OM (2004) Reproductive tissue selective actions of progesterone receptors. *Reproduction* 128:139-146
- Murphy D (2002) Gene expression studies using microarrays: principles, problems, and prospects. *Adv Physiol Educ* 26:256-270
- Nakada M, Nakada S, Demuth T, Tran NL, Hoelzinger DB, Berens ME (2007) Molecular targets of glioma invasion. *Cell Mol Life Sci* 64:458-478
- National-Cancer-Institute (2012) Comprehensive Cancer Information. National Cancer Institute
- Nguyen DX, Bos PD, Massague J (2009) Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization. *Nature reviews Cancer* 9:274-284
- Ohgaki H, Kleihues P (2007) Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *Am J Pathol* 170:1445-1453
- Okamoto H, Mineta T, Nakahara Y, Ichinose M, Shiraishi T, Tabuchi K (2004) Molecular analysis of astrocytoma associated with Turcot syndrome type 1--case report. *Neurologia medico-chirurgica* 44:124-128
- Olson JJ, Beck DW, Schlechte J, Loh PM (1986) Hormonal manipulation of meningiomas in vitro. *J Neurosurg* 65:99-107
- Oriola J, Costa D, Oliva R (2004) Cáncer. In: Rafael O, Ballesta F, Oriola J, Claria J (eds) *Genética Médica*, 3a. edición edn. Publicacions I Edicions de la Universitat de Barcelona, España, pp 213-228
- Park-Sarge OK, Mayo KE (1994) Regulation of the progesterone receptor gene by gonadotropins and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate in rat granulosa cells. *Endocrinology* 134:709-718
- Park S, Bae J, Nam BH, Yoo KY (2008) Aetiology of cancer in Asia. *Asian Pac J Cancer Prev* 9:371-380
- Pathiraja TN, Shetty PB, Jelinek J, He R, Hartmaier R, Margossian AL, Hilsenbeck SG, Issa JP, Oesterreich S (2011) Progesterone receptor isoform-specific promoter methylation: association of PRA promoter methylation with worse

- outcome in breast cancer patients. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 17:4177-4186
- Patrinos GP, Kollia P, Papadakis MN (2005) Molecular diagnosis of inherited disorders: lessons from hemoglobinopathies. *Hum Mutat* 26:399-412
- Paulssen RH, Moe B, Gronaas H, Orbo A (2008) Gene expression in endometrial cancer cells (Ishikawa) after short time high dose exposure to progesterone. *Steroids* 73:116-128
- Paz H, Pathak N, Yang J (2013) Invading one step at a time: the role of invadopodia in tumor metastasis. *Oncogene*
- Pérez L, Rodríguez E, Figueredo R, Barroso E (2001) Astrocitoma anaplásico y glioblastoma multiforme. Factores que influyen en la supervivencia. *Rev Cubana Cir* 40:87-91
- Porter A (2012) A Dead End: A Review of Glioblastoma Multiforme. *Eukaryon* 8:5
- Purmonen S, Manninen T, Pennanen P, Ylikomi T (2008) Progestins regulate genes that can elicit both proliferative and antiproliferative effects in breast cancer cells. *Oncology reports* 19:1627-1634
- 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* 284:19572-19579
- Rivas MA, Venturutti L, Huang YW, Schillaci R, Huang TH, Elizalde PV (2012) Downregulation of the tumor-suppressor miR-16 via progestin-mediated oncogenic signaling contributes to breast cancer development. *Breast cancer research : BCR* 14:R77
- Rodriguez AM, Palou A (2004) The steroid RU486 induces UCP1 expression in brown adipocytes. *Pflugers Arch* 449:170-174
- Rubin R, Strayer DS (2012) The pathology of neoplasia. In: Rubin R, Strayer DS (eds) *Rubin's Pathology: Clinicopathologic Foundations of Medicine*, 6th. edn. Wolters Kluwer|Lippincot Williams & Wilkins, Unites States, pp 158-212
- Sager G, Orbo A, Jaeger R, Engstrom C (2003) Non-genomic effects of progestins--inhibition of cell growth and increased intracellular levels of cyclic nucleotides. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 84:1-8
- 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. *The Journal of pathology* 188:289-293
- Sarkar C, Jain A, Suri V (2009) Current concepts in the pathology and genetics of gliomas. *Indian J Cancer* 46:108-119
- Sasaki T, Hiroki K, Yamashita Y (2013) The role of epidermal growth factor receptor in cancer metastasis and microenvironment. *BioMed research international* 2013:546318
- Scarpin KM, Graham JD, Mote PA, Clarke CL (2009) Progesterone action in human tissues: regulation by progesterone receptor (PR) isoform expression, nuclear positioning and coregulator expression. *Nuclear receptor signaling* 7:e009
- Schittenhelm J (2011) Diagnostic Evaluation of Diffuse Gliomas. In: Chen C (ed) *Advances in the Biology, Imaging and Therapies for Glioblastoma*. InTech, pp 199-224

- Schneider T, Sailer M, Ansorge S, Firsching R, Reinhold D (2006) Increased concentrations of transforming growth factor beta1 and beta2 in the plasma of patients with glioblastoma. *J Neurooncol* 79:61-65
- Schumacher M, Guennoun R (2009) Progesterone: Synthesis, Metabolism, Mechanisms of Action and Effects in the Nervous System. An overview. In: Pfaff D, Arnold A, Etgen A, Fahrbach S, Rubin R (eds) *Hormones, Brain and Behavior*, 2 edn. Academic Press, USA, pp 1506-1523
- Schwartzbaum JA, Fisher JL, Aldape KD, Wrensch M (2006) Epidemiology and molecular pathology of glioma. *Nature clinical practice Neurology* 2:494-503; quiz 491 p following 516
- Shao W, Espenshade PJ Expanding roles for SREBP in metabolism. *Cell Metab* 16:414-419
- Silvera SA, Miller AB, Rohan TE (2006) Hormonal and reproductive factors and risk of glioma: a prospective cohort study. *International journal of cancer Journal international du cancer* 118:1321-1324
- Singh M, Su C, Ng S (2013) Non-genomic mechanisms of progesterone action in the brain. *Frontiers in neuroscience* 7:159
- Smith CJ, Osborn AM (2009) Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. *FEMS microbiology ecology* 67:6-20
- Souto Del Bosque R, Aguilar S, Poitevin A, Suchil L, Dávila L, Celis MA, Mota A, Gómez E (2001) Astrocitomas cerebrales. Factores pronósticos en una serie de pacientes tratados en México. *Revista de Oncología* 3:5
- Sozen S, Coskun U, Sancak B, Bukan N, Gunel N, Tunc L, Bozkirli I (2004) Serum levels of interleukin-18 and nitrite+nitrate in renal cell carcinoma patients with different tumor stage and grade. *Neoplasma* 51:25-29
- Speirs V, Boyle-Walsh E, Fraser WD (1997) Constitutive co-expression of estrogen and progesterone receptor mRNA in human meningiomas by RT-PCR and response of in vitro cell cultures to steroid hormones. *International journal of cancer Journal international du cancer* 72:714-719
- Speroff L, Fritz MA (2005) Hormone Biosynthesis, Metabolism, and Mechanisms of Action. In: Speroff L, Fritz MA (eds) *Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility*. Lippincott Williams and Wilkins, USA, pp 32-44
- Spitz IM (2003) Progesterone antagonists and progesterone receptor modulators: an overview. *Steroids* 68:981-993
- Stachenfeld NS, Silva C, Keefe DL (2000) Estrogen modifies the temperature effects of progesterone. *J Appl Physiol* 88:1643-1649
- Stein DG, Wright DW, Kellermann AL (2008) Does progesterone have neuroprotective properties? *Annals of emergency medicine* 51:164-172
- Stricker T, Kumar V (2009) Characteristics of Benign and Malignant Neoplasms. In: Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Aster JC (eds) *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease*. Saunders Elsevier, Philadelphia
- Stupp R, Tonn JC, Brada M, Pentheroudakis G, Group EGW (2010) High-grade malignant glioma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 21 Suppl 5:v190-193



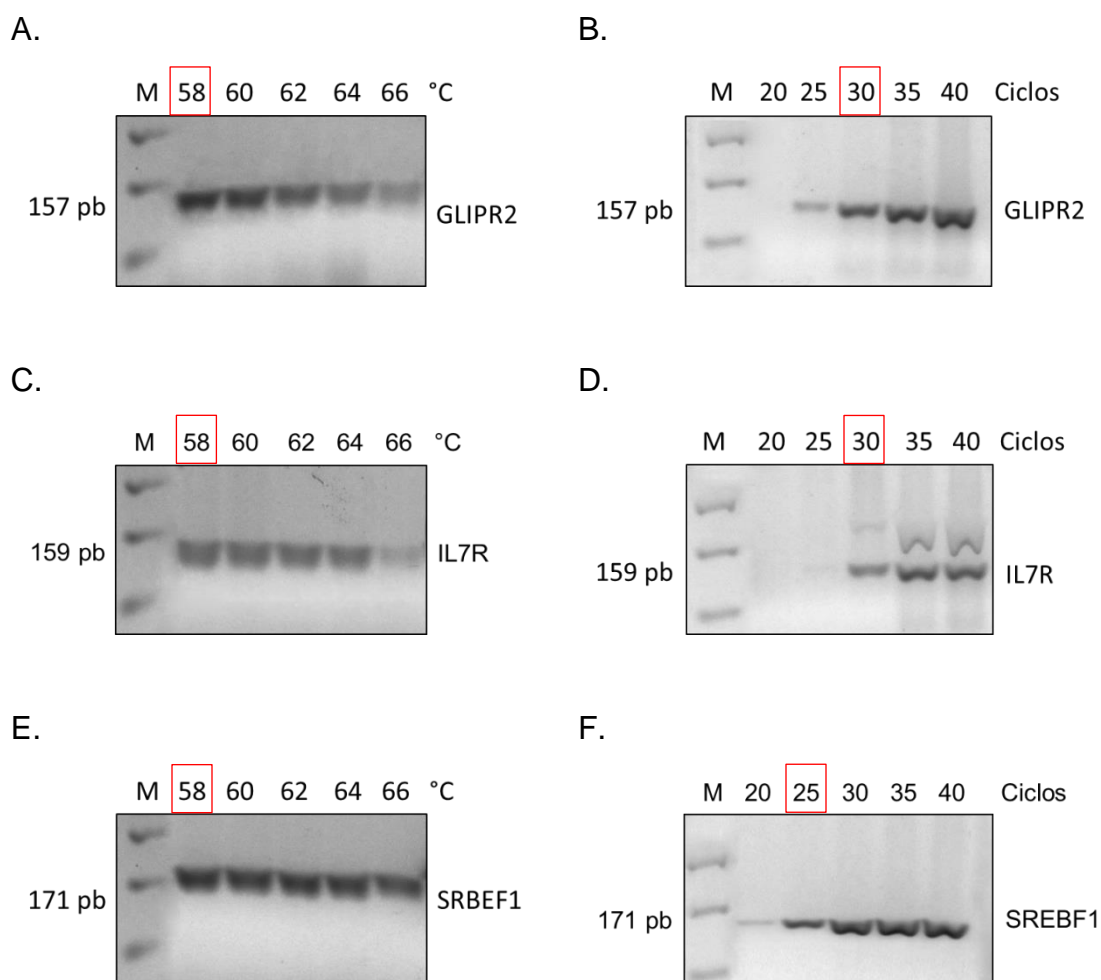
- Suárez-Calderón DM, Díaz-Yamal I (2008) Antagonistas de receptores de progesterona (PRA) y moduladores selectivos de receptores de progesterona (SPRM): aplicaciones en ginecología y obstetricia. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología* 59:7
- Suzuki C, Daigo Y, Ishikawa N, Kato T, Hayama S, Ito T, Tsuchiya E, Nakamura Y (2005) ANLN plays a critical role in human lung carcinogenesis through the activation of RHOA and by involvement in the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway. *Cancer research* 65:11314-11325
- Tait SW, Green DR (2010) Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nature reviews Molecular cell biology* 11:621-632
- Tan P (2006) *Experimental Validation of Microarray Data*. Singapore, p 24
- Tetel MJ, Lange CA (2009) *Molecular Genomics of Progestin Actions*. In: Pfaff D, Arnold A, Etgen A, Fahrbach S, Rubin R (eds) *Hormones, Brain and Behavior*. Academic Press, USA, pp 1439-1465
- Theveny B, Bailly A, Rauch C, Rauch M, Delain E, Milgrom E (1987) Association of DNA-bound progesterone receptors. *Nature* 329:79-81
- Thompson EW, Newgreen DF, Tarin D (2005) Carcinoma invasion and metastasis: a role for epithelial-mesenchymal transition? *Cancer research* 65:5991-5995; discussion 5995
- Toiyama Y, Miki C, Inoue Y, Kawamoto A, Kusunoki M (2009) Circulating form of human vascular adhesion protein-1 (VAP-1): decreased serum levels in progression of colorectal cancer and predictive marker of lymphatic and hepatic metastasis. *J Surg Oncol* 99:368-372
- True L, Feng Z (2005) Immunohistochemical validation of expression microarray results. *The Journal of molecular diagnostics : JMD* 7:149-151
- Walter LM, Rogers PA, Girling JE (2005) The role of progesterone in endometrial angiogenesis in pregnant and ovariectomised mice. *Reproduction* 129:765-777
- Wang X, Li X, Li D, Li X, Zhu X, Guo X (2011) Neuroprotective effect of progesterone in newborn rats with hypoxic-ischemic encephalopathy. *International Journal of the Physical Sciences* 6:7
- Ward RD, Weigel NL (2009) Steroid receptor phosphorylation: Assigning function to site-specific phosphorylation. *BioFactors* 35:528-536
- Wen L, Chen LH, Li HY, Chang SP, Liao CY, Tsui KH, Sung YJ, Chao KC (2009) Roles of estrogen and progesterone in endometrial hemodynamics and vascular endothelial growth factor production. *Journal of the Chinese Medical Association : JCMA* 72:188-193
- Westphal U, Harding GB (1973) Steroid-protein interactions. XXVII. Progesterone binding to polymers of human serum albumin. *Biochim Biophys Acta* 310:518-527
- Witsch E, Sela M, Yarden Y (2010) Roles for growth factors in cancer progression. *Physiology* 25:85-101
- Wittekind C, Neid M (2005) Cancer invasion and metastasis. *Oncology* 69 Suppl 1:14-16
- Xi S, Zhang Y, Lin S, Liang J, Zeng J, Wu Q (2012) Intraparenchymal chordoid meningioma: a case report and review of the literature. *International journal of surgical pathology* 20:600-605

- Xu Q, Ohara N, Chen W, Liu J, Sasaki H, Morikawa A, Sitruk-Ware R, Johansson ED, Maruo T (2006) Progesterone receptor modulator CDB-2914 down-regulates vascular endothelial growth factor, adrenomedullin and their receptors and modulates progesterone receptor content in cultured human uterine leiomyoma cells. *Human reproduction* 21:2408-2416
- Yamada H, Shinmura K, Yamamura Y, Kurachi K, Nakamura T, Tsuneyoshi T, Yokota N, Maekawa M, Sugimura H (2009) Identification and characterization of a novel germline p53 mutation in a patient with glioblastoma and colon cancer. *International journal of cancer Journal international du cancer* 125:973-976
- Yamada S, Yamaguchi T, Hosoda A, Iwawaki T, Kohno K (2006) Regulation of human STARD4 gene expression under endoplasmic reticulum stress. *Biochem Biophys Res Commun* 343:1079-1085
- Yuan L, Hillman JD, Progulsk-Fox A (2005) Microarray analysis of quorum-sensing-regulated genes in *Porphyromonas gingivalis*. *Infection and immunity* 73:4146-4154
- 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* 105:45-54
- Zheng SG, Wang J, Wang P, Gray JD, Horwitz DA (2007) IL-2 is essential for TGF-beta to convert naive CD4+CD25- cells to CD25+Foxp3+ regulatory T cells and for expansion of these cells. *J Immunol* 178:2018-2027
- 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. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 9:3369-3375

## 12. ANEXOS

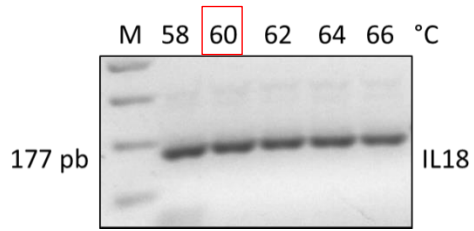
### 12.1. Estandarización de las condiciones para PCR

Antes de proceder con las reacciones de RT-PCR para los experimentos en los cuales se incluyeron los 4 tipos de tratamiento mencionados (V, P<sub>4</sub>, P<sub>4</sub>+RU y RU486), como se indicó en la metodología, se realizó la curva de temperaturas y de ciclos para cada uno de los genes estudiados (Figura 24). La amplificación del gen de 18S se realizó a 58°C y 25 ciclos.; no se realizaron curvas para este gen debido a que su expresión ya fue estandarizada anteriormente para las condiciones utilizadas.

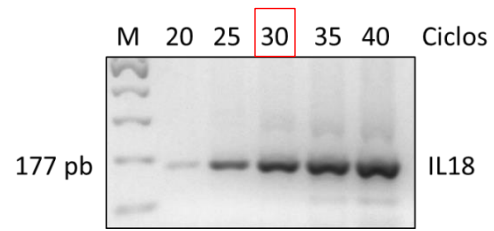




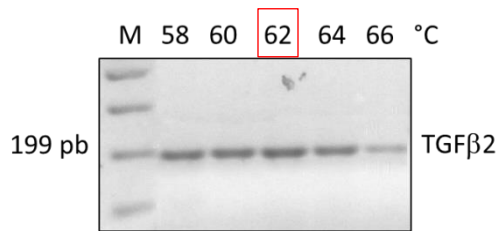
G.



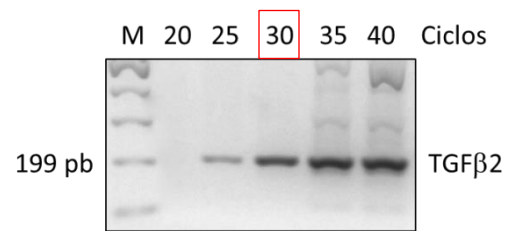
H.



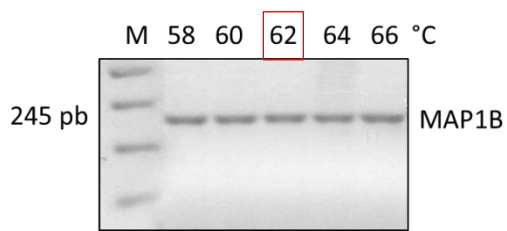
I.



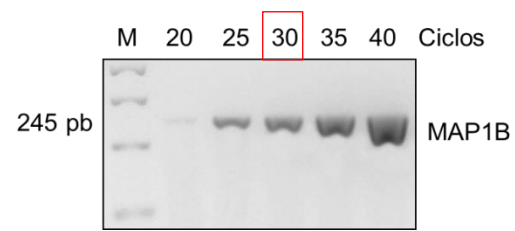
J.



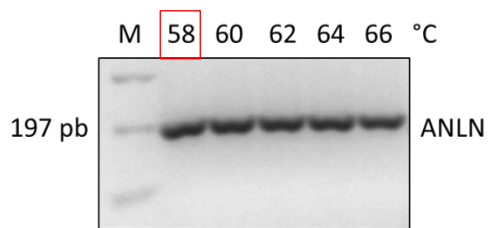
K.



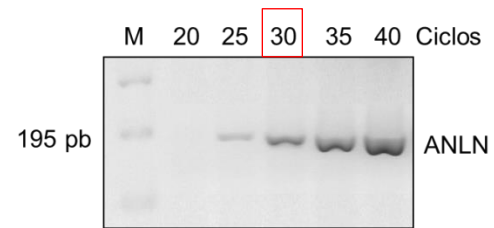
L.



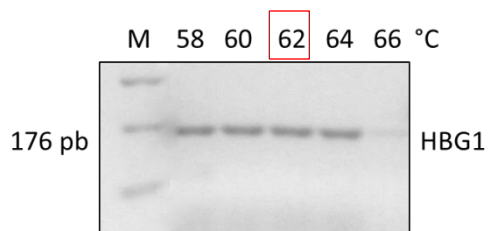
M.



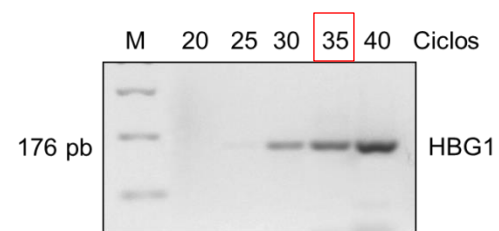
N.

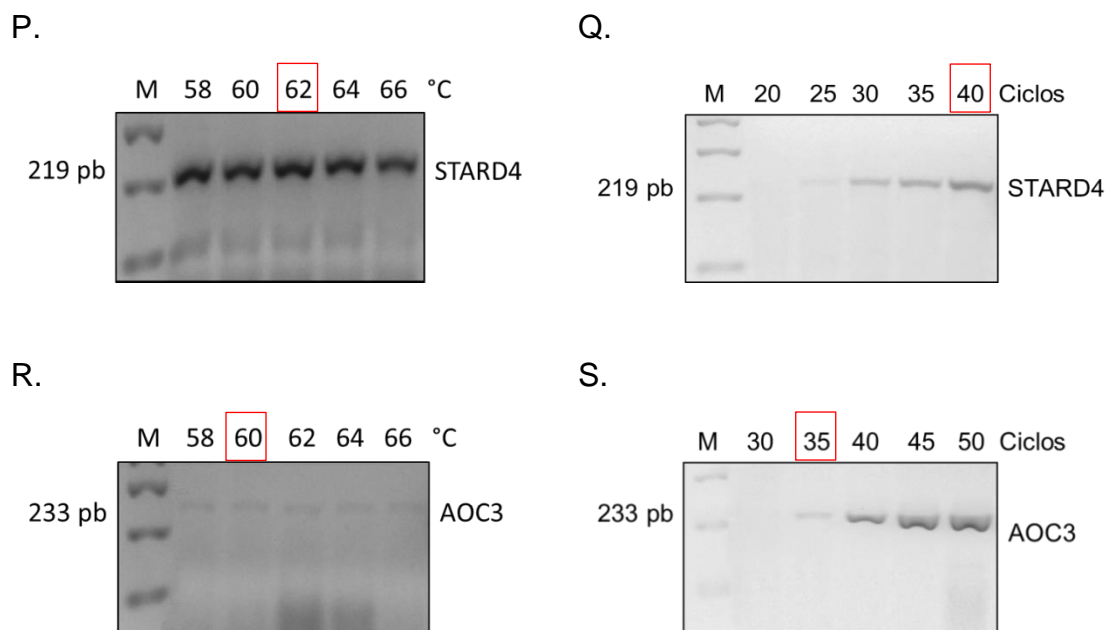


Ñ.



O.





**Figura 24.** Curvas de determinación de temperaturas y de ciclos para la amplificación de GLIPR2, IL7R, SRBEF1, IL18, TGF $\beta$ 2, MAP1B, ANLN, HBG1, STARD4 y AOC3. A, C, E, G, I, K, M, Ñ, P y R) Curvas de calibración de temperaturas a 58, 60, 62, 64 y 66 °C a 30 ciclos. B, D, F, H, J, L, N, O, Q y S) Curvas de ciclos (20, 25, 30, 35 y 40, excepto para AOC3 en donde el número de ciclos fueron 30, 35, 40, 45 y 50 ya que a 30 ciclos casi no se observó amplificación). Los geles fueron teñidos con el colorante Gel Red (Biotium). Los recuadros que enmarcan un cierto valor señalan la temperatura o el número de ciclos elegidos para cada gen. El número de ciclos elegido se encuentra en la fase exponencial de la curva.

## 12.2. Listas de genes diferencialmente expresados

A continuación se muestran las 6 listas de expresión diferencial que resultan al comparar los niveles de expresión promedio entre tratamientos. Los nombres en color verde, al igual que en los mapas de calor, señalan a los genes subexpresados, mientras que en color rojo se señalan los sobreexpresados. Es importante mencionar que en estas listas se omitió a las secuencias diferencialmente expresadas que no presentaron anotación, es decir, que aún no se conoce que estén asociadas a un gen o función.

**Tabla 6.** Genes diferencialmente expresados con P<sub>4</sub> respecto al tratamiento con V.

| P <sub>4</sub> vs. V |                |                |        |                |                |
|----------------------|----------------|----------------|--------|----------------|----------------|
| Número               | Nombre del gen | Tasa de cambio | Número | Nombre del gen | Tasa de cambio |
| 1                    | VTRNA1-1       | 2.2            | 16     | SLITRK1        | 1.4            |
| 2                    | SNORD116-26    | 1.9            | 17     | PCDHB18        | 1.4            |
| 3                    | FABP4          | 1.9            | 18     | KRT33B         | 1.4            |
| 4                    | SNORA14A       | 1.8            | 19     | VIPR2          | 1.4            |
| 5                    | SNORD25        | 1.8            | 20     | HGC6.3         | 1.4            |
| 6                    | SNORA41        | 1.7            | 21     | CADPS          | 1.5            |
| 7                    | SIAE           | 1.6            | 22     | GOT1L1         | 1.5            |
| 8                    | SNORA28        | 1.6            | 23     | FPR2           | 1.5            |
| 9                    | SNORA14B       | 1.5            | 24     | OR6Q1          | 1.5            |
| 10                   | HSD17B7P2      | 1.5            | 25     | NCRNA00200     | 1.5            |
| 11                   | IL18           | 1.5            | 26     | AOC3           | 1.5            |
| 12                   | RNU2-1         | 1.5            | 27     | PNPLA4         | 1.5            |
| 13                   | SNORD38B       | 1.5            | 28     | FLJ16171       | 1.7            |
| 14                   | SNORD53        | 1.5            | 29     | HBG1           | 2.7            |
| 15                   | C9orf152       | 1.4            | 30     | HBG2           | 2.7            |

**Tabla 7.** Genes diferencialmente expresados con P<sub>4</sub>+RU respecto al tratamiento con V.

| P <sub>4</sub> +RU vs. V |                |                |        |                |                |
|--------------------------|----------------|----------------|--------|----------------|----------------|
| Número                   | Nombre del gen | Tasa de cambio | Número | Nombre del gen | Tasa de cambio |
| 1                        | SNORD116-26    | 2.5            | 20     | DDX46          | 1.8            |
| 2                        | SCARNA1        | 2.3            | 21     | COPS2          | 1.8            |
| 3                        | NARG1          | 2.3            | 22     | RSBN1L         | 1.7            |
| 4                        | SLC39A10       | 2.2            | 23     | C1orf58        | 1.7            |
| 5                        | SNORD116-25    | 2.2            | 24     | YTHDC2         | 1.7            |
| 6                        | FLJ45950       | 2.2            | 25     | ZNF451         | 1.7            |
| 7                        | MYBL1          | 2.2            | 26     | RAI14          | 1.7            |
| 8                        | DLGAP5         | 2.1            | 27     | CXADR          | 1.7            |
| 9                        | PSD3           | 2.0            | 28     | SEMA6D         | 1.7            |
| 10                       | SNORD82        | 2.0            | 29     | C9orf41        | 1.7            |
| 11                       | CCDC15         | 2.0            | 30     | CEP55          | 1.7            |
| 12                       | ANLN           | 1.9            | 31     | EPM2AIP1       | 1.7            |
| 13                       | C5orf36        | 1.9            | 32     | ADD3           | 1.7            |
| 14                       | BRCC3          | 1.8            | 33     | TBC1D15        | 1.7            |
| 15                       | TET2           | 1.8            | 34     | BBS10          | 1.7            |
| 16                       | ABCA1          | 1.8            | 35     | KIAA1012       | 1.7            |
| 17                       | C11orf82       | 1.8            | 36     | CTAGE5         | 1.7            |
| 18                       | ECHDC1         | 1.8            | 37     | ADAM9          | 1.7            |
| 19                       | SESN3          | 1.8            | 38     | SIAE           | 1.7            |

| P <sub>4</sub> +RU vs. V |                |                |        |                |                |
|--------------------------|----------------|----------------|--------|----------------|----------------|
| Número                   | Nombre del gen | Tasa de cambio | Número | Nombre del gen | Tasa de cambio |
| 39                       | NUCKS1         | 1.7            | 80     | PCDHB3         | 1.5            |
| 40                       | CUL2           | 1.7            | 81     | SNORD13        | 1.5            |
| 41                       | STARD4         | 1.7            | 82     | LOC642947      | 1.5            |
| 42                       | THUMPD1        | 1.7            | 83     | CENPI          | 1.4            |
| 43                       | ZNF280C        | 1.6            | 84     | ITSN1          | 1.4            |
| 44                       | SNORA41        | 1.6            | 85     | EPHA3          | 1.4            |
| 45                       | PJA2           | 1.6            | 86     | TGFB2          | 1.4            |
| 46                       | FAM115A        | 1.6            | 87     | SFRS11         | 1.4            |
| 47                       | PSD3           | 1.6            | 88     | HIST1H2AH      | 1.4            |
| 48                       | TOPBP1         | 1.6            | 89     | ZNF571         | 1.4            |
| 49                       | ERCC6L         | 1.6            | 90     | SELI           | 1.4            |
| 50                       | CHORDC1        | 1.6            | 91     | PCMTD1         | 1.4            |
| 51                       | GNPTAB         | 1.6            | 92     | KLHL8          | 1.4            |
| 52                       | UTP20          | 1.6            | 93     | UTP23          | 1.4            |
| 53                       | EIF3A          | 1.6            | 94     | OR4D11         | 1.4            |
| 54                       | ZBTB6          | 1.6            | 95     | VEGFA          | 1.4            |
| 55                       | HIST1H3A       | 1.6            | 96     | MRAP2          | 1.4            |
| 56                       | SKIV2L2        | 1.6            | 97     | SLC7A1         | 1.4            |
| 57                       | SCAMP1         | 1.6            | 98     | MTHFD2         | 1.4            |
| 58                       | MAGI3          | 1.6            | 99     | ETV4           | 1.5            |
| 59                       | POLI           | 1.6            | 100    | SESN2          | 1.5            |
| 60                       | MAP1B          | 1.5            | 101    | PTGES          | 1.5            |
| 61                       | FAM35A         | 1.5            | 102    | PCDHA11        | 1.5            |
| 62                       | FAM111A        | 1.5            | 103    | LOC100131434   | 1.5            |
| 63                       | IDE            | 1.5            | 104    | HEY1           | 1.5            |
| 64                       | ARRDC3         | 1.5            | 105    | AARS           | 1.5            |
| 65                       | ZNF432         | 1.5            | 106    | OR2T11         | 1.5            |
| 66                       | TOP1           | 1.5            | 107    | GPC3           | 1.5            |
| 67                       | HIST1H3G       | 1.5            | 108    | ARHGEF2        | 1.5            |
| 68                       | LTV1           | 1.5            | 109    | CARS           | 1.5            |
| 69                       | HIST1H3J       | 1.5            | 110    | CD177          | 1.5            |
| 70                       | PALB2          | 1.5            | 111    | GPT2           | 1.6            |
| 71                       | OR2M3          | 1.5            | 112    | GLIPR2         | 1.6            |
| 72                       | HIST1H1T       | 1.5            | 113    | LOC645188      | 1.6            |
| 73                       | LGR4           | 1.5            | 114    | MTHFD2         | 1.6            |
| 74                       | RANBP6         | 1.5            | 115    | SLC25A20       | 1.6            |
| 75                       | ABCD3          | 1.5            | 116    | TRIB3          | 1.7            |
| 76                       | AKAP12         | 1.5            | 117    | PHGDH          | 1.7            |
| 77                       | IL7R           | 1.5            | 118    | FLJ16171       | 1.7            |
| 78                       | ELF2           | 1.5            | 119    | PSAT1          | 1.7            |
| 79                       | GPR137C        | 1.5            | 120    | SLC1A4         | 1.7            |

| P <sub>4</sub> +RU vs. V |                |                |        |                |                |
|--------------------------|----------------|----------------|--------|----------------|----------------|
| Número                   | Nombre del gen | Tasa de cambio | Número | Nombre del gen | Tasa de cambio |
| 121                      | MST1           | 1.7            | 127    | NUPR1          | 2.0            |
| 122                      | YARS           | 1.7            | 128    | ASNS           | 2.0            |
| 123                      | LOC285456      | 1.9            | 129    | CBS            | 2.1            |
| 124                      | PCK2           | 1.9            | 130    | CPT1A          | 2.1            |
| 125                      | GDF15          | 1.9            | 131    | SLC6A9         | 2.3            |
| 126                      | CHAC1          | 2.0            |        |                |                |

**Tabla 8.** Genes diferencialmente expresados con RU486 respecto al tratamiento con V.

| RU486 vs. V |                |                |        |                |                |
|-------------|----------------|----------------|--------|----------------|----------------|
| Número      | Nombre del gen | Tasa de cambio | Número | Nombre del gen | Tasa de cambio |
| 1           | LST-3TM12      | 2.0            | 22     | GLIPR2         | 1.5            |
| 2           | FLJ45950       | 1.8            | 23     | NCRNA00200     | 1.5            |
| 3           | HIST1H1T       | 1.6            | 24     | LCN1           | 1.5            |
| 4           | STARD4         | 1.6            | 25     | ZNF487         | 1.5            |
| 5           | ABCA1          | 1.6            | 26     | SLC1A4         | 1.6            |
| 6           | OR2M3          | 1.5            | 27     | PSAT1          | 1.6            |
| 7           | KIF27          | 1.5            | 28     | PHGDH          | 1.6            |
| 8           | HSD17B7P2      | 1.5            | 29     | TRIB3          | 1.7            |
| 9           | SREBF1         | 1.5            | 30     | CHAC1          | 1.7            |
| 10          | PPP4R1L        | 1.4            | 31     | FLJ16171       | 1.7            |
| 11          | IL7R           | 1.4            | 32     | PCK2           | 1.8            |
| 12          | SSX3           | 1.4            | 33     | CD177          | 1.8            |
| 13          | AARS           | 1.4            | 34     | GDF15          | 1.8            |
| 14          | YARS           | 1.4            | 35     | CPT1A          | 1.8            |
| 15          | MTHFD2         | 1.4            | 36     | CBS            | 2.0            |
| 16          | CLRN2          | 1.4            | 37     | SLC6A9         | 2.0            |
| 17          | MT1F           | 1.4            | 38     | NUPR1          | 2.0            |
| 18          | SLC1A3         | 1.4            | 39     | ASNS           | 2.0            |
| 19          | SLC25A20       | 1.5            | 40     | HBG1           | 3.2            |
| 20          | CCIN           | 1.5            | 41     | HBG2           | 3.2            |
| 21          | MST1           | 1.5            |        |                |                |

**Tabla 9.** Genes diferencialmente expresados con P<sub>4</sub> respecto al tratamiento de P<sub>4</sub>+RU.

| P <sub>4</sub> vs. P <sub>4</sub> +RU |                |                |        |                |                |
|---------------------------------------|----------------|----------------|--------|----------------|----------------|
| Número                                | Nombre del gen | Tasa de cambio | Número | Nombre del gen | Tasa de cambio |
| 1                                     | ASNS           | 2.4            | 5      | CPT1A          | 2.3            |
| 2                                     | FABP4          | 2.4            | 6      | GDF15          | 2.3            |
| 3                                     | VTRNA1-1       | 2.3            | 7      | CHAC1          | 2.2            |
| 4                                     | SLC6A9         | 2.3            | 8      | SNORA28        | 2.1            |

| P <sub>4</sub> vs. P4+RU |                |                |        |                |                |
|--------------------------|----------------|----------------|--------|----------------|----------------|
| Número                   | Nombre del gen | Tasa de cambio | Número | Nombre del gen | Tasa de cambio |
| 9                        | PCK2           | 2.1            | 50     | ORC5L          | 1.5            |
| 10                       | CBS            | 2.1            | 51     | SNORA16A       | 1.5            |
| 11                       | NUPR1          | 2.1            | 52     | CXorf56        | 1.5            |
| 12                       | SCARNA4        | 2.0            | 53     | C12orf24       | 1.5            |
| 13                       | SNORD53        | 2.0            | 54     | RNU13P2        | 1.5            |
| 14                       | SNORD30        | 2.0            | 55     | TSPAN5         | 1.5            |
| 15                       | PSAT1          | 2.0            | 56     | SNORA10        | 1.5            |
| 16                       | PHGDH          | 1.9            | 57     | SNORA10        | 1.5            |
| 17                       | YARS           | 1.9            | 58     | ATF4           | 1.5            |
| 18                       | SNORD25        | 1.9            | 59     | GARS           | 1.5            |
| 19                       | SNORD27        | 1.9            | 60     | SQRDL          | 1.5            |
| 20                       | SNORA14B       | 1.8            | 61     | ETV5           | 1.5            |
| 21                       | SESN2          | 1.8            | 62     | IMPA2          | 1.5            |
| 22                       | SLC1A4         | 1.8            | 63     | MAFG           | 1.5            |
| 23                       | MTHFD2         | 1.8            | 64     | SLC7A1         | 1.5            |
| 24                       | POLR3GL        | 1.8            | 65     | PTGES          | 1.5            |
| 25                       | GPT2           | 1.8            | 66     | PPCS           | 1.5            |
| 26                       | TRIB3          | 1.8            | 67     | SLC16A4        | 1.5            |
| 27                       | HMOX1          | 1.7            | 68     | PYCR1          | 1.5            |
| 28                       | ETV4           | 1.7            | 69     | IFRD1          | 1.5            |
| 29                       | SLC25A20       | 1.7            | 70     | IL6            | 1.5            |
| 30                       | GLIPR2         | 1.7            | 71     | MARS           | 1.5            |
| 31                       | SNORA73A       | 1.7            | 72     | TUBE1          | 1.5            |
| 32                       | CSTA           | 1.7            | 73     | VAT1L          | 1.5            |
| 33                       | CARS           | 1.6            | 74     | RPS6KA2        | 1.5            |
| 34                       | MTX2           | 1.6            | 75     | ARMCX6         | 1.5            |
| 35                       | DDIT3          | 1.6            | 76     | SNORD102       | 1.5            |
| 36                       | ADAMTS9        | 1.6            | 77     | SLC3A2         | 1.5            |
| 37                       | PLXNA2         | 1.6            | 78     | WARS           | 1.5            |
| 38                       | MTHFD2         | 1.6            | 79     | SYT13          | 1.5            |
| 39                       | SNORD28        | 1.6            | 80     | TACR1          | 1.5            |
| 40                       | DUSP6          | 1.6            | 81     | AAGAB          | 1.5            |
| 41                       | ARHGEF2        | 1.6            | 82     | KLHL5          | 1.5            |
| 42                       | CCDC51         | 1.6            | 83     | NNMT           | 1.5            |
| 43                       | SSRP1          | 1.6            | 84     | SNORA14A       | 1.5            |
| 44                       | UGT2B7         | 1.6            | 85     | TTC1           | 1.4            |
| 45                       | SNORD49A       | 1.6            | 86     | FAM86B1        | 1.4            |
| 46                       | SCARNA13       | 1.6            | 87     | LRRC4          | 1.4            |
| 47                       | SPRY2          | 1.6            | 88     | SLC25A33       | 1.4            |
| 48                       | AARS           | 1.5            | 89     | FAM103A1       | 1.4            |
| 49                       | SNORD26        | 1.5            | 90     | IL18           | 1.4            |

| P <sub>4</sub> vs. P <sub>4</sub> +RU |                |                |        |                |                |
|---------------------------------------|----------------|----------------|--------|----------------|----------------|
| Número                                | Nombre del gen | Tasa de cambio | Número | Nombre del gen | Tasa de cambio |
| 91                                    | RNF185         | 1.4            | 122    | TGFB2          | 1.6            |
| 92                                    | TBL1X          | 1.4            | 123    | ZBTB6          | 1.6            |
| 93                                    | FYN            | 1.4            | 124    | HIST1H2AK      | 1.6            |
| 94                                    | TMEM101        | 1.4            | 125    | SNORA70B       | 1.6            |
| 95                                    | VEGFA          | 1.4            | 126    | TOPBP1         | 1.6            |
| 96                                    | PCOTH          | 1.4            | 127    | LOC221442      | 1.6            |
| 97                                    | KCNJ2          | 1.4            | 128    | PJA2           | 1.6            |
| 98                                    | FAM103A1       | 1.4            | 129    | EIF3A          | 1.6            |
| 99                                    | HMGCL          | 1.4            | 130    | FAM115A        | 1.6            |
| 100                                   | PITPNC1        | 1.4            | 131    | OR2T4          | 1.6            |
| 101                                   | LOC401805      | 1.4            | 132    | ECHDC1         | 1.6            |
| 102                                   | LOC401805      | 1.4            | 133    | C1orf58        | 1.7            |
| 103                                   | C1orf109       | 1.4            | 134    | TET2           | 1.7            |
| 104                                   | MRAP2          | 1.4            | 135    | EPM2AIP1       | 1.7            |
| 105                                   | KCNE4          | 1.4            | 136    | PSD3           | 1.7            |
| 106                                   | SNORD36C       | 1.4            | 137    | SEMA6D         | 1.7            |
| 107                                   | MYC            | 1.4            | 138    | CXADR          | 1.7            |
| 108                                   | ZNF487         | 1.4            | 139    | NCAPG          | 1.7            |
| 109                                   | SOCS5          | 1.4            | 140    | CTAGE5         | 1.7            |
| 110                                   | MAML2          | 1.4            | 141    | SERBP1         | 1.8            |
| 111                                   | EPHA3          | 1.4            | 142    | ABCA1          | 1.8            |
| 112                                   | GPR137C        | 1.4            | 143    | ZBTB38         | 1.8            |
| 113                                   | GPR52          | 1.4            | 144    | DDX46          | 1.8            |
| 114                                   | PCDHB18        | 1.5            | 145    | TET2           | 1.8            |
| 115                                   | AKAP12         | 1.5            | 146    | C5orf36        | 1.9            |
| 116                                   | MITF           | 1.5            | 147    | SESN3          | 1.9            |
| 117                                   | ABCD3          | 1.5            | 148    | ANLN           | 1.9            |
| 118                                   | OR2M1P         | 1.5            | 149    | SLC39A10       | 2.0            |
| 119                                   | FAM35A         | 1.5            | 150    | NUF2           | 2.0            |
| 120                                   | ERCC6L         | 1.5            | 151    | PSD3           | 2.1            |
| 121                                   | MAP1B          | 1.6            | 152    | DLGAP5         | 2.4            |

**Tabla 10.** Genes diferencialmente expresados con P<sub>4</sub> respecto al tratamiento de RU486.

| P <sub>4</sub> vs. RU486 |                |                |        |                |                |
|--------------------------|----------------|----------------|--------|----------------|----------------|
| Número                   | Nombre del gen | Tasa de cambio | Número | Nombre del gen | Tasa de cambio |
| 1                        | ASNS           | 2.4            | 6      | SLC6A9         | 2.0            |
| 2                        | FABP4          | 2.2            | 7      | CHAC1          | 1.9            |
| 3                        | GDF15          | 2.1            | 8      | CBS            | 1.9            |
| 4                        | NUPR1          | 2.0            | 9      | PCK2           | 1.9            |
| 5                        | CPT1A          | 2.0            | 10     | PHGDH          | 1.9            |

| P <sub>4</sub> vs. RU486 |                |                |        |                |                |
|--------------------------|----------------|----------------|--------|----------------|----------------|
| Número                   | Nombre del gen | Tasa de cambio | Número | Nombre del gen | Tasa de cambio |
| 11                       | PSAT1          | 1.8            | 34     | VAT1L          | 1.5            |
| 12                       | AKR1B10        | 1.8            | 35     | TMTC2          | 1.5            |
| 13                       | TRIB3          | 1.8            | 36     | PXK            | 1.5            |
| 14                       | SCARNA4        | 1.7            | 37     | SESN2          | 1.5            |
| 15                       | SLC1A4         | 1.6            | 38     | DDIT3          | 1.5            |
| 16                       | CSTA           | 1.6            | 39     | ARMCX6         | 1.5            |
| 17                       | DUSP6          | 1.6            | 40     | GARS           | 1.5            |
| 18                       | RNU4-2         | 1.6            | 41     | ETV5           | 1.5            |
| 19                       | GLIPR2         | 1.6            | 42     | TUBE1          | 1.4            |
| 20                       | YARS           | 1.6            | 43     | AARS           | 1.4            |
| 21                       | MTHFD2         | 1.6            | 44     | ARHGEF2        | 1.4            |
| 22                       | MTHFD2         | 1.6            | 45     | C10orf122      | 1.4            |
| 23                       | SNORA28        | 1.6            | 46     | MGP            | 1.4            |
| 24                       | SNORD53        | 1.6            | 47     | SNORD14E       | 1.4            |
| 25                       | SNORA41        | 1.6            | 48     | ATF4           | 1.4            |
| 26                       | ADAMTS9        | 1.5            | 49     | GPT2           | 1.4            |
| 27                       | SPRY4          | 1.5            | 50     | PNPLA4         | 1.4            |
| 28                       | SLC25A20       | 1.5            | 51     | SREBF1         | 1.5            |
| 29                       | SLC1A3         | 1.5            | 52     | KRT15          | 1.5            |
| 30                       | SNORA14A       | 1.5            | 53     | GCOM1          | 1.5            |
| 31                       | SPRY2          | 1.5            | 54     | ABCA1          | 1.5            |
| 32                       | SNORD38B       | 1.5            | 55     | PPP4R1L        | 1.6            |
| 33                       | KCNJ2          | 1.5            | 56     | CYP4Z1         | 1.6            |

**Tabla 11.** Genes diferencialmente expresados con P<sub>4</sub> respecto al tratamiento de P<sub>4</sub>+RU.

| P <sub>4</sub> +RU vs. RU486 |                |                |        |                |                |
|------------------------------|----------------|----------------|--------|----------------|----------------|
| Número                       | Nombre del gen | Tasa de cambio | Número | Nombre del gen | Tasa de cambio |
| 1                            | SNORD116-26    | 2.2            | 10     | TARP           | 1.5            |
| 2                            | ECHDC1         | 1.6            | 11     | SNORD13        | 1.5            |
| 3                            | C5orf36        | 1.6            | 12     | SNORD13        | 1.5            |
| 4                            | NUCKS1         | 1.6            | 13     | OR2T4          | 1.4            |
| 5                            | LTV1           | 1.6            | 14     | DQX1           | 1.4            |
| 6                            | LOC221442      | 1.5            | 15     | SSX3           | 1.4            |
| 7                            | SNORA41        | 1.5            | 16     | ARID3B         | 1.4            |
| 8                            | ZNF487         | 1.5            | 17     | S100A7L2       | 1.5            |
| 9                            | TARP           | 1.5            | 18     | PPP4R1L        | 1.6            |