



# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

## **Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

**Estudio de los efectos del factor de bloqueo inducido por progesterona (PIBF)  
en la migración e invasión de células derivadas de astrocitomas humanos.**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestra en Ciencias

PRESENTA:

**Q.F.B. Araceli Gutiérrez Rodríguez**

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Ignacio Camacho Arroyo  
Facultad de Química

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Mahara Angélica Valverde Ramírez  
Instituto de Investigaciones Biomédicas

Dra. Marcela Lizano Soberón  
Instituto de Investigaciones Biomédicas

Ciudad de México. Marzo, 2017

## **AGRADECIMIENTOS**

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

A la Dra. Valeria Hansberg Pastor de la Facultad de Química, UNAM por su asesoría y apoyo técnico durante la realización de este trabajo.

A los miembros del comité tutorial, la Dra. Mahara Angélica Valverde Ramírez y la Dra. Marcela Lizano Soberón del Instituto de Investigaciones Biomédicas por su asesoría en este proyecto.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico No. 250866, al Programa de Apoyo a la Investigación y al Posgrado (PAIP, 5000-9107) de la Facultad de Química, UNAM y al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) IN201414 de la DGAPA, UNAM por el financiamiento concedido para el desarrollo de este trabajo.

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

## ÍNDICE

<b>1. Resumen .....</b>	<b>1</b>
<b>2. Introducción.....</b>	<b>2</b>
2.1. Gliomas.....	2
2.2. Progesterona ( $P_4$ ) .....	5
2.2.1. Estructura y función de la $P_4$ .....	5
2.2.2. Mecanismo de acción.....	7
2.3. Receptor a $P_4$ .....	10
2.3.1. Características .....	10
2.3.2. Isoformas.....	10
2.4. Factor de bloqueo inducido por progesterona (PIBF) .....	12
2.4.1. Características .....	12
2.4.2. Receptor del PIBF y receptor de Interleucina 4 (IL-4R) .....	16
2.4.3. El PIBF como molécula inmunomoduladora.....	19
<b>3. Antecedentes .....</b>	<b>21</b>
3.1. El PIBF y glioblastomas.....	21
<b>4. Planteamiento del problema.....</b>	<b>23</b>
<b>5. Hipótesis .....</b>	<b>23</b>
<b>6. Objetivos .....</b>	<b>24</b>
6.1. Objetivo general.....	24
6.2. Objetivos particulares .....	24

<b>7. Metodología .....</b>	<b>24</b>
7.1. Cultivo celular .....	24
7.2. Extracción de RNA.....	25
7.3. RT.....	25
7.4. PCR .....	26
7.5. Extracción de proteínas .....	27
7.6. Western Blot .....	27
7.7. Conteo celular.....	29
7.8. Ensayo de proliferación celular.....	29
7.9. Ensayo de migración celular.....	30
7.10. Ensayo de invasión celular .....	30
7.11. Silenciamiento génico .....	32
7.12. Análisis estadístico .....	32
<b>8. Resultados .....</b>	<b>33</b>
8.1. Expresión del PIBF a nivel del mRNA en la línea celular U87 y su regulación por la $P_4$ .....	33
8.2. Expresión del PIBF a nivel de la proteína en la línea celular U87 y su regulación por la $P_4$ .....	35
8.3. Efecto del PIBF sobre el número de células en la línea U87.....	37
8.4. Papel del PIBF en la proliferación de células U87 derivadas de un glioblastoma humano.....	39
8.5. Participación del PIBF en la migración en las líneas celulares U87 y U251 derivadas de glioblastomas humanos.....	41
8.6. Efecto del PIBF en la invasión de las células U87 y U251.....	43
8.7. Participación del IL-4R $\alpha$ en los procesos invasivos mediados por el PIBF en células U87 derivadas de un astrocitoma humano grado IV.....	45
<b>9. Discusión .....</b>	<b>47</b>
<b>10. Conclusiones.....</b>	<b>52</b>

**11. Perspectivas ..... 53**

**12. Referencias ..... 54**

**13. Anexos ..... 63**

*13.1. Artículo original en revista indizada ..... 63*

**Gutiérrez-Rodríguez A, Hansberg-Pastor V, Camacho-Arroyo I (2017).**

Proliferative and invasive effects of progesterone-induced blocking factor in human glioblastoma cells. BioMed Research International. doi: 10.1155/2017/1295087

*13.2. Artículo en revista nacional arbitrada..... 75*

**Gutiérrez-Rodríguez A, Camacho-Arroyo I (2016).** Papel del factor de

bloqueo inducido por progesterona (PIBF) en embarazo y cáncer. TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas. Vol. 19, No. 2: 109-115.

*13.3. Artículo en revista de divulgación científica ..... 83*

**Gutiérrez-Rodríguez A, Zamora-Sánchez C, Camacho-Arroyo I (2016).** Las

hormonas sexuales en el desarrollo de tumores cerebrales. AAPAUNAM, Año 8 No.1: 28-32.

## 1. Resumen

El factor de bloqueo inducido por progesterona (PIBF) es una proteína regulada por progesterona ( $P_4$ ). Este factor se expresa en diferentes tipos de células altamente proliferativas incluyendo los astrocitomas, que son los tumores más frecuentes y agresivos que se presentan en el sistema nervioso central (SNC), y cuya capacidad para invadir diversas áreas cerebrales, su resistencia al tratamiento y su recurrencia a corto plazo ocasionan la tasa más alta de muerte causada por tumores cerebrales. Se ha demostrado que la  $P_4$  induce crecimiento e invasión celular en líneas derivadas de astrocitomas, tanto *in vitro* como *in vivo* en un modelo murino, a través de la interacción con su receptor intracelular (RP), sin embargo, los mecanismos involucrados en estos procesos no han sido completamente dilucidados. Se ha demostrado que el PIBF incrementa el número de células derivadas de un astrocitoma humano de grado III. En este trabajo, se evaluó la regulación del PIBF mediada por la  $P_4$ , así como los efectos de este factor en la proliferación, migración e invasión de las células U87 y U251, ambas líneas derivadas de astrocitomas humanos de grado IV (glioblastomas). La expresión del PIBF a nivel del RNA mensajero (mRNA) fue regulada a la alta por la  $P_4$  (10 nM) de las 12 a las 24 horas. Las células de glioblastoma humano expresan dos isoformas del PIBF, 90 y 57 kDa. El contenido de la isoforma corta se incrementó con el tratamiento con  $P_4$  a las 24 horas, mientras que el antagonista del RP, mifepristona o RU486 (10  $\mu$ M) bloqueó este efecto. El PIBF recombinante (rPIBF, 100 y 200 ng/ml) incrementó el número de células U87 en los días 4 y 5 del tratamiento, e indujo proliferación celular al día 4. Ensayos de migración celular mostraron que el rPIBF incrementó la migración de las células U87 (12 - 48 horas) y U251 (24 y 48 horas). Los ensayos de invasión celular mostraron que el rPIBF aumentó el número de células invasivas en ambas líneas celulares a las 24 h. En ensayos de migración con células cuya expresión génica del IL-4R $\alpha$  fue disminuida por medio de RNAs de interferencia, no se observó ningún bloqueo de los efectos del rPIBF. Estos resultados sugieren que el PIBF es regulado por  $P_4$  y promueve la proliferación, migración e invasión de las células de glioblastomas humanos.

## **2. Introducción**

### **2.1. Gliomas**

Los gliomas malignos representan los tumores primarios cerebrales más comunes y su capacidad para invadir el parénquima cerebral circundante es la causa principal de recurrencia del tumor (Hwang et al., 2008) y aunado a la resistencia a la terapia, ocasionan la falla del tratamiento (Furnari et al., 2007). Los gliomas se clasifican de acuerdo a sus características inmunohistoquímicas y moleculares en: astrocitomas, oligodendrogliomas y ependimomas (Louis et al., 2016), de los cuales los astrocitomas son los más comunes con un 75% de incidencia. Los astrocitomas se presentan principalmente en adultos con edades entre 45 y 70 años y poseen un alto potencial de malignidad (Ostrom et al., 2015).

Los astrocitomas pueden surgir de astrocitos, células progenitoras comprometidas con linaje astrocítico o células troncales de glioma (Alcantara Llaguno et al., 2009; Cheng et al., 2010; Schonberg et al., 2013). En astrocitomas humanos se han descrito una variedad de mutaciones que afectan principalmente a genes involucrados en la regulación del ciclo celular y apoptosis como el gen de la cinasa 4 dependiente de ciclina (CDK4), del inhibidor de la cinasa dependiente de ciclina (INK4A) y de la proteína tumoral 53 (p53). Asimismo, se encuentra alterada la expresión de genes como el del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) que promueven la angiogénesis y el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) que promueve la división celular (Hernández-Hernández et al., 2012; Ichimura et al., 2004).

Los astrocitomas se clasifican por la OMS en cuatro grados (I-IV) de acuerdo a sus características fenotípicas y genotípicas, tales como atipia nuclear, celularidad, vascularidad, actividad mitótica, necrosis y mutaciones específicas (Louis et al., 2016; Masui et al., 2016; Daumas-Duport et al., 1969) en:

- Astrocitoma pilocítico (grado I)

Es un tumor bien delimitado, de crecimiento lento, que suele ser quístico y se presenta generalmente en niños y adultos jóvenes. Afecta comúnmente al nervio óptico, cerebro, cerebelo y tallo cerebral. La resección quirúrgica total es la principal estrategia terapéutica. En la mayoría de los casos cuando el tumor ha sido extraído total o parcialmente, las probabilidades de una sobrevida mayor a 20 años son de más del 85% (Tihan & Bloomer, 2010). Frecuentemente presentan alteraciones en el homólogo del oncogen viral de sarcoma murino B1 (BRAF) (Masui et al., 2016).

- Astrocitoma difuso (grado II)

Se caracteriza por un crecimiento lento y poca infiltración en estructuras cerebrales adyacentes. Generalmente afecta a adultos jóvenes con un pico de incidencia entre los 30 y 40 años, además puede evolucionar a un grado mayor de malignidad. Se localiza en cualquier región del SNC pero con más frecuencia en el cerebro, tallo cerebral y médula espinal. El tratamiento puede incluir resección quirúrgica, quimioterapia y/o radioterapia. La media de sobrevivencia después de la intervención quirúrgica es de 6 a 8 años (Arko et al., 2010). Pueden presentar mutaciones en los genes de isocitrato deshidrogenasa 1 o 2 (IDH1/ IDH2) o en TP53 (Masui et al., 2016).

- Astrocitoma anaplásico (grado III)

Este tipo de tumor puede surgir a partir de un astrocitoma difuso o manifestarse de *novo* y tienden a progresar a astrocitoma de grado IV. Se caracteriza por presentar una alta actividad mitótica, atipia nuclear y lesiones difusamente infiltrantes. El promedio de edad en los pacientes es de 40 años. Se localizan preferentemente en el cerebro. El tratamiento puede incluir resección quirúrgica parcial, quimioterapia y/o radioterapia. El tiempo de sobrevida en estos pacientes es de 2 a 3 años (Louis et al., 2016; Arko et al., 2010). Las aberraciones más comunes que se presentan en este tipo de tumores son las mutaciones en los genes IDH1/IDH2 y en el gen que codifica para la transcriptasa reversa de la telomerasa (TERT) (Masui et al., 2016).



- Glioblastoma multiforme (o astrocitoma de grado IV)

Este tipo de tumor se puede generar a partir de un astrocitoma difuso o anaplásico, sin embargo, lo más frecuente es que aparezca de *novo*. Es altamente infiltrante, la mayor incidencia se presenta entre las edades de 45 a 70 años y afecta principalmente al cerebro. El glioblastoma multiforme (GBM) es el tumor cerebral primario maligno más frecuente, comprendiendo un 55% de todos los gliomas malignos (Ostrom et al. 2015); presenta alta celularidad con células pleomórficas que expresan marcadores de linaje astrocítico, presentan además atipia nuclear y citoplasmática, frecuentes mitosis, necrosis y proliferación endotelial (Louis et al., 2016). El glioblastoma se divide genotípicamente en IDH silvestre (el 90% de los casos), que se encuentra de forma frecuente en los glioblastomas *de novo* y predomina en pacientes de más de 55 años, y con IDH mutado (el 10% de los casos) que corresponde a los glioblastomas secundarios que provienen de los astrocitomas de grados más bajos; presentan además mutaciones en TERT, p53, en el supresor tumoral homólogo de fosfatasa y tensina en el cromosoma 10 (PTEN), en el gen de neurofibromatosis tipo 1 (NF1), en EGFR, en el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas A (PDGFRA) y en genes de cinasas dependientes de ciclinas (CDK4 y CDK6) (Masui et al., 2016).

Su resistencia a las terapias convencionales, el rápido crecimiento y la naturaleza invasiva hacen necesario el uso de terapias agresivas, incluyendo la resección del tumor, así como el tratamiento combinado de radioterapia y quimioterapia, esta última basada en temozolomida, que es un agente alquilante con actividad antitumoral utilizado en el tratamiento contra gliomas (Furnari et al., 2007; Stupp et al, 2009), sin embargo, la resección quirúrgica agresiva con frecuencia no es posible debido a la extensa invasión en el cerebro, y el tratamiento con radioterapia es limitado por la toxicidad. El GBM tiene un tiempo corto de reincidencia (7 meses aproximadamente) consiguiente al tratamiento estándar (Authier et al., 2015; Stupp et al., 2005), causando que los pacientes con esta clase de tumores tengan un tiempo de sobrevida promedio de 12 a 15 meses (Brandes et al., 2008).

Los glioblastomas se presentan de forma más frecuente en hombres que en mujeres en una relación 3:2 (Ostrom et al., 2015), por lo que se ha prestado particular interés en el papel que las hormonas sexuales tienen en este tipo de patologías. En estudios *in vitro* realizados en nuestro laboratorio y por otros grupos de investigación, se ha relacionado a la P<sub>4</sub> con la progresión del cáncer, ya que se ha demostrado que a concentraciones de 1 nM, 10 nM, 100 nM y 1 µM, la P<sub>4</sub> promueve el crecimiento de astrocitomas humanos, al inducir la proliferación celular en las líneas U373 y D54 derivadas de astrocitomas humanos de grados III y IV, respectivamente (González-Agüero et al., 2007), así como la migración e invasión celulares en las líneas D54 y U251, ambas derivadas de astrocitomas humanos de grado IV (Piña-Medina et al., 2016).

Asimismo, en estudios *in vivo* realizados también en nuestro laboratorio, se demostró que la P<sub>4</sub> promueve el crecimiento y la migración de células U373 derivadas de astrocitoma humano implantadas en la corteza motora de ratas a través de la interacción con el RP (Germán-Castelán, et al., 2014). Además, se ha reportado que la P<sub>4</sub> induce la expresión de genes involucrados en la progresión del ciclo celular y metástasis tales como ciclina D1, EGFR y VEGF en células derivadas de astrocitomas humanos (Hernández-Hernández, et al., 2012).

## 2.2. Progesterona (P<sub>4</sub>)

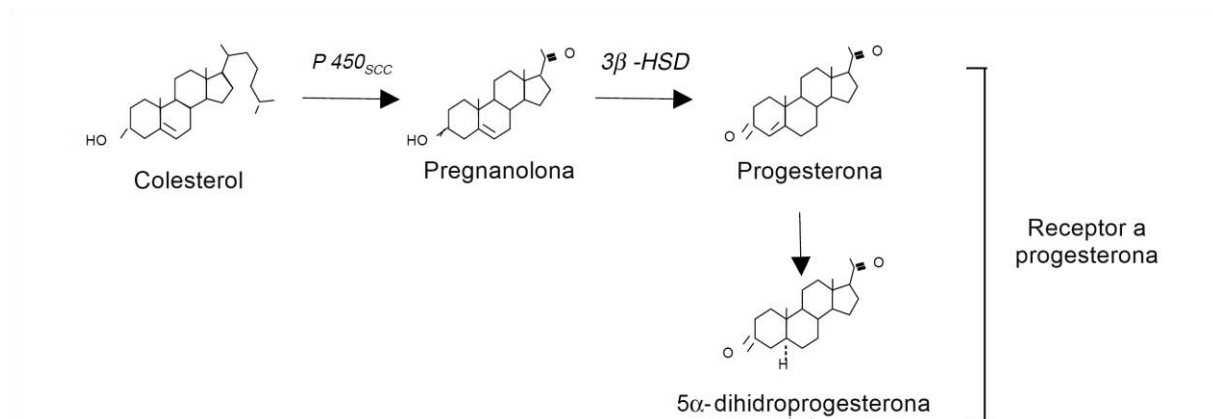
### 2.2.1. Estructura y función de la P<sub>4</sub>

La P<sub>4</sub> (4-pregnen-3,20-diona) es una hormona esteroide de 21 átomos de carbono derivada del colesterol, tiene un núcleo de ciclopentanoperhidrofenantreno y es sintetizada por los ovarios, placenta y glándulas suprarrenales, además también es sintetizada por neuronas y células gliales. Su concentración cambia bajo diferentes estados fisiológicos y patológicos (Brunton & Rossell, 2008; Paul & Purdy, 1992; Melcangi et al., 2014).

La P<sub>4</sub> regula diversas funciones tales como el comportamiento sexual, la neuroprotección, la ovulación, así como el establecimiento y mantenimiento del embarazo participando en el desarrollo uterino, implantación e inmunomodulación.

Además, se le ha relacionado con la progresión del cáncer (Szekeres-Bartho et al., 2001; Brinton et al., 2009; González-Agüero et al., 2007).

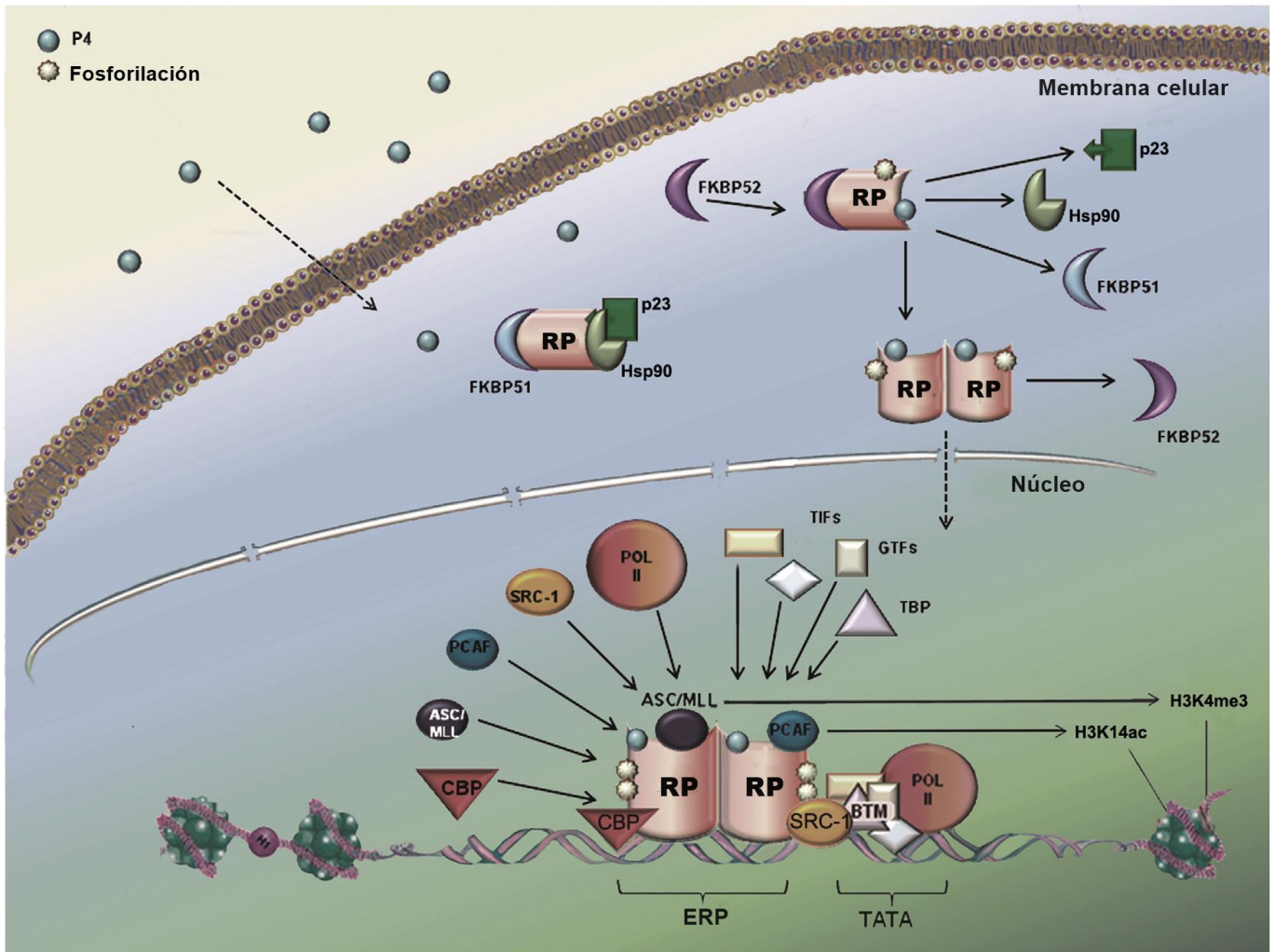
Como se puede observar en el diagrama que se muestra en la **figura 1**, esta hormona se puede sintetizar de *novo* a partir del colesterol o bien del metabolismo de sus precursores provenientes de la circulación. Su precursor directo: la pregnanolona, que proviene de la circulación y de la síntesis local de *novo* con la conversión del colesterol mediada por el citocromo P450<sub>scc</sub>, está expresado en el SNC (Schumacher et al., 2004).



**Figura 1. Biosíntesis y metabolismo de la P<sub>4</sub>.** La conversión de colesterol a pregnanolona es catalizada por el citocromo P450<sub>scc</sub> (scc, escisión de la cadena lateral). La pregnanolona es entonces convertida a progesterona por la 3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa (3β-HSD). La P<sub>4</sub> a su vez es metabolizada por la 5α-reductasa a 5α-dihidroprogesterona. La P<sub>4</sub> y la 5α-dihidroprogesterona activan la transcripción de genes al unirse con el RP (Tomado de Schumacher et al., 2004).

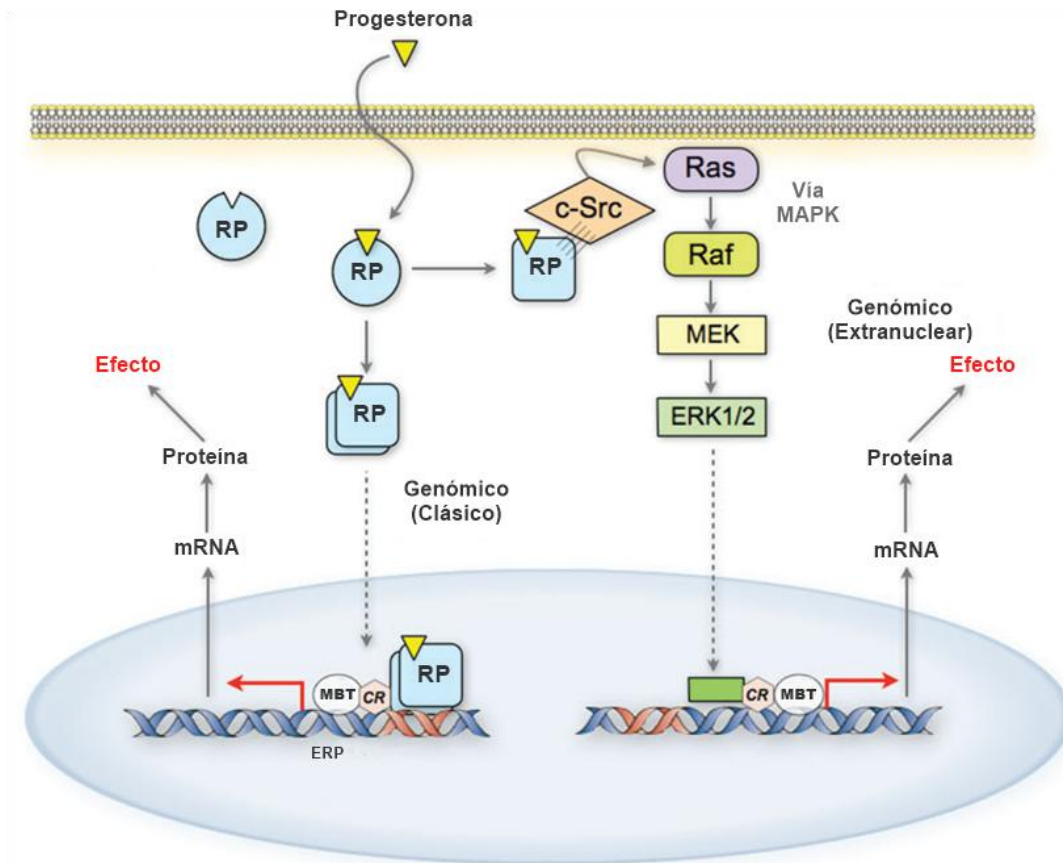
### 2.2.2. Mecanismo de acción

La P<sub>4</sub> usa múltiples vías de señalización: la clásica (genómica), involucra la regulación de la expresión génica después de su unión con el RP, el cual pertenece a la superfamilia de factores de transcripción regulados por ligando (Levine et al., 2001; Schumacher et al., 2004; Camacho-Arroyo & Rodríguez-Dorantes, 2006). En este mecanismo, mostrado en la **figura 2**, en ausencia de hormona el RP se mantiene en un estado de gran afinidad por su ligando a través de su asociación con chaperonas como las proteínas de choque térmico (Hsp90) y otras cochaperonas. Cuando la P<sub>4</sub> entra a la célula e interactúa con su receptor, le induce un cambio conformacional que promueve su fosforilación, la disociación del complejo de las chaperonas, su dimerización y posteriormente su traslocación al núcleo. Los dímeros del RP se unen a los elementos de respuesta a la P<sub>4</sub> (ERP) en la región promotora de genes blanco, lo que promueve la transcripción de estos genes. La transcripción se inicia a través del reclutamiento de coactivadores de complejos de remodelación de la cromatina que promueve la unión de la maquinaria basal de transcripción (BTM) (Schumacher et al., 2014; Camacho-Arroyo et al., 2017).



**Figura 2. Mecanismo de acción genómico de la P<sub>4</sub>.** En ausencia de hormona, el RP interactúa con la chaperona Hsp90 y las cochaperonas FKBP51 y p23. Cuando la P<sub>4</sub> entra a la célula e interactúa con el RP, se induce un cambio conformacional que promueve la fosforilación del RP, su disociación de las chaperonas y cochaperonas y posteriormente se une a la cochaperona FKBP52 que facilita la dimerización de las isoformas del RP y su traslocación al núcleo. El receptor activo se une entonces a elementos de respuesta a progesterona (ERPs) de los genes blanco. La transcripción de genes inducida por el RP requiere del reclutamiento de coactivadores específicos tales como SRC-1 y CBP, así como el factor asociado a p300/CBP (PCAF) y el complejo ASC/MLL que promueven la acetilación de la histona H3 (H3K14ac) y la trimetilación de H3K4 (H3K4me3), respectivamente. El complejo RP/coreguladores interactúa con complejos de remodelación de la cromatina para promover el reclutamiento de la maquinaria basal de la transcripción (BTM) para activar la transcripción de genes. TIF: factor del inicio de la transcripción; GTF: factor general de la transcripción; TBP: proteína de unión a la caja TATA; Pol II: RNA polimerasa II. (Tomado de Camacho-Arroyo et al., 2017).

La vía no clásica (o no genómica) requiere la interacción de la hormona con canales iónicos y receptores membranales específicos, lo cual induce la formación de segundos mensajeros como el AMPc, así como la activación de cinasas (Patel et al., 2014). Esta vía no clásica actúa generalmente rápido y no depende de la síntesis de mRNA (Simoncini et al., 2003). Como se detalla en la **figura 3**, en la vía genómica directa, el RP funciona como factor de transcripción activado por ligando e interactúa directamente con correguladores transcripcionales para modular la expresión de genes, mientras que en la vía extranuclear indirecta, el RP interactúa con Src tirosina cinasas en el citoplasma para activar la vía de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPKs) las cuales afectan la expresión de genes (Boonyaratanakornkit et al., 2008; Leonhardt et al., 2003).



**Figura 3. Vías de señalización genómica activadas por el RP.** En respuesta al ligando, el RP presenta un cambio conformacional y se dimeriza. Los receptores entonces se traslocan al núcleo donde funcionan como factores de transcripción activados por ligando. Los receptores también activan cascadas de señalización

citoplásmicas tales como la vía de la proteína cinasa activada por mitógenos (ERK/MAPK), por la interacción directa con las moléculas de señalización extranuclear. MBT, maquinaria basal de transcripción; CR, coreguladores. (Tomado de Patel et al., 2014).

## 2.3 Receptor a P<sub>4</sub>

### 2.3.1 Características

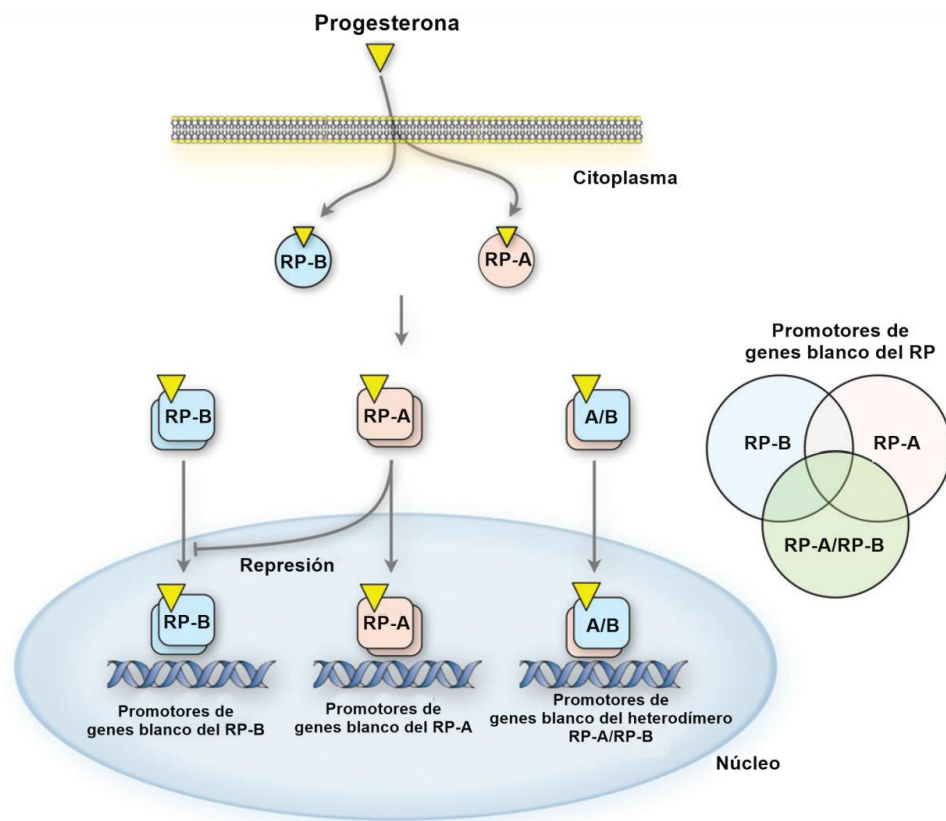
Muchos de los efectos de la P<sub>4</sub> en células blanco son mediados por el RP, el cual está compuesto por 4 dominios funcionales: un dominio regulador N-terminal, un dominio de unión al DNA (DBD) que comprende dos dedos de zinc, una región bisagra y el dominio de unión al ligando en C-terminal (LBD), el cual también está involucrado en la dimerización del receptor. Además, incluye dominios de función de activación (AF) y de inhibición (IF) (Camacho-Arroyo & Rodríguez-Dorantes, 2006).

La activación del RP no sólo depende de la unión directa de su propio ligando, sino también de modificaciones postraduccionales como fosforilación (Hagan et al., 2012). Las MAPKs y la proteína cinasa C (PKC) son capaces de fosforilar el RP, incrementando su actividad transcripcional y posteriormente promueven su poliubiquitinación y por lo tanto su degradación por el proteosoma 26S (González-Arenas et al., 2015; Camacho-Arroyo et al., 2002), que es una proteína de 2100 kDa que cataliza la hidrólisis dependiente de ATP de proteínas unidas a ubiquitina (Lange et al., 2000).

### 2.3.2 Isoformas

Los RP humanos son codificados por un solo gen localizado en el cromosoma 11 (11q22-q23), su expresión es controlada por dos promotores para producir dos transcritos mayores de mRNA que codifican dos proteínas: RP-B (116 kDa) y RP-A (94 kDa) (Wen et al., 1994; Leonhardt et al., 2003), que difieren por un segmento de aminoácidos adicional -164- en la región N-terminal del RP-B (Kastner et al., 1990; Conneely & Lydon, 2000).

El dominio de unión al DNA, la región bisagra y el dominio de unión a ligando son idénticos en el RP-A y el RP-B, la diferencia entre los dos RP está en el dominio regulador N-terminal que está truncado por 164 aminoácidos en el RP-A, por lo que se encuentran solamente en el RP-B (Giangrande & McDonnell, 1999). En la actualidad es generalmente aceptado que la respuesta a P<sub>4</sub> está determinada por las acciones combinadas del RP-A y el RP-B, las cuales posterior a la unión del ligando, forman homodímeros o heterodímeros que tienen distintas actividades transcripcionales como se observa en la **figura 4**.



**Figura 4. Interacción funcional entre el RP-A y el RP-B.** Posterior a la unión del ligando, los receptores forman homo y heterodímeros transcripcionalmente activos que afectan la expresión de conjuntos de genes comunes y específicos. El RP-A también actúa como un transrepresor del RP-B en algunos promotores (Tomado de Patel et al., 2014).

El RU486 es un antagonista que, tal como la P<sub>4</sub>, se une al RP y promueve la dimerización de sus isoformas, sin embargo, produce un cambio conformacional



diferente a la hormona, en el receptor. Los dímeros RP-B promueven la activación de la transcripción de genes, pero esto no ocurre con los dímeros RP-A, debido a que estos últimos funcionan principalmente como represores de la transcripción génica mediada por el RP-B. EL RU486 genera la formación de homo- o heterodímeros de RP-A, lo que conlleva a la disminución de la transcripción de los genes blanco (Chen et al., 2014). La isoforma predominante del RP expresada en los astrocitomas de grados III y IV es RP-B. Se sabe que la isoforma RP-A inhibe los efectos de la  $P_4$  en el crecimiento de estas células. (González-Agüero et al., 2001; Cabrera-Muñoz et al., 2009). Se ha documentado en varios trabajos que el RU486 bloquea el aumento del crecimiento de astrocitomas humanos inducido por  $P_4$  (Cabrera-Muñoz et al., 2011; González-Agüero et al., 2007).

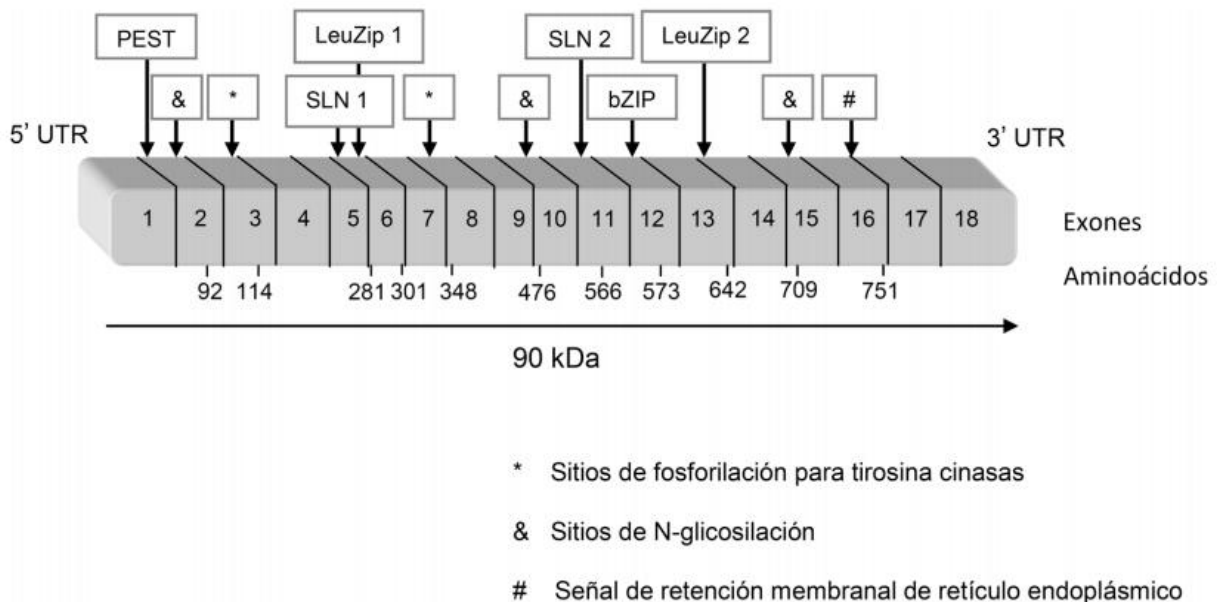
La  $P_4$  ejerce además efectos inmunológicos que se han documentado ampliamente durante el embarazo. Mediante la interacción de la hormona con el RP, se promueve la transcripción del gen del PIBF, que consiste en 18 exones y cuyo mRNA sufre de un proceso de “splicing” alternativo, por lo que codifica para proteínas con distinto peso molecular, entre ellas se encuentra la proteína de 90 kDa codificada por el mRNA de tamaño completo y una isoforma de 34 kDa que en un inicio se descubrió que era secretada por linfocitos maternos  $\gamma/\delta$ . La actividad inmunomoduladora que presenta este factor, permite que el embrión tenga mecanismos de evasión del sistema inmunológico de la madre durante en el embarazo para que éste llegue a término. Se sugiere que estos mecanismos son algunos de los que utilizan las células tumorales para evadir el sistema inmunológico, por lo que estas células podrían contribuir a dirigir la producción del PIBF a través de la secreción de  $P_4$  (Check et al., 2009; Szekeres-Bartho & Polgar 2010).

## *2.4 Factor de bloqueo inducido por progesterona (PIBF)*

### *2.4.1. Características*

El gen del PIBF se localiza en el cromosoma 13 (13q21-q22), cerca del gen de susceptibilidad de cáncer de mama BRCA2 (Lachmann et al., 2004). El mapeo de la secuencia del DNA complementario (cDNA) codificante del PIBF y la caracterización

de la proteína resultante mediante el uso de una biblioteca de cDNA obtenida de células de hígado humano, dio como resultado una clona con un marco de lectura abierto de 2271 pb entre una región de 347 pb y 146 pb de 5' a 3' sin traducir (5' a 3' UTR). En la posición de 348 pb se encuentra el codón de inicio de traducción (ATG) (Polgar et al., 2003). El PIBF contiene dos señales de localización nuclear (SNL), un dominio bZIP que se encuentra en proteínas que funcionan como factores de transcripción, el cual consiste en una región básica de unión al DNA y dos zippers de leucina (LeuZip) que median la homo- y heterodimerización de las proteínas bZip (Lachmann et al., 2004), el resultado final de este análisis se muestra en la **figura 5**.



**Figura 5. Dominios del gen del PIBF.** El gen del PIBF contiene 18 exones, los cuales codifican para una proteína de 90 kDa, organizada en diversos dominios funcionales. PEST: secuencia peptídica con residuos de prolina (P), ácido glutámico (E), serina (S), y treonina (T); SNL: señal de localización nuclear; LeuZip: zipper de leucina; bZIP: zipper básico de leucina (Tomado de Gutiérrez-Rodríguez & Camacho-Arroyo, 2016).

A través de la clonación y secuenciación de fragmentos de PCR, se determinó la composición de exones de las isoformas resultantes del proceso de “splicing” alternativo del mRNA del PIBF en diferentes tipos celulares, utilizando células

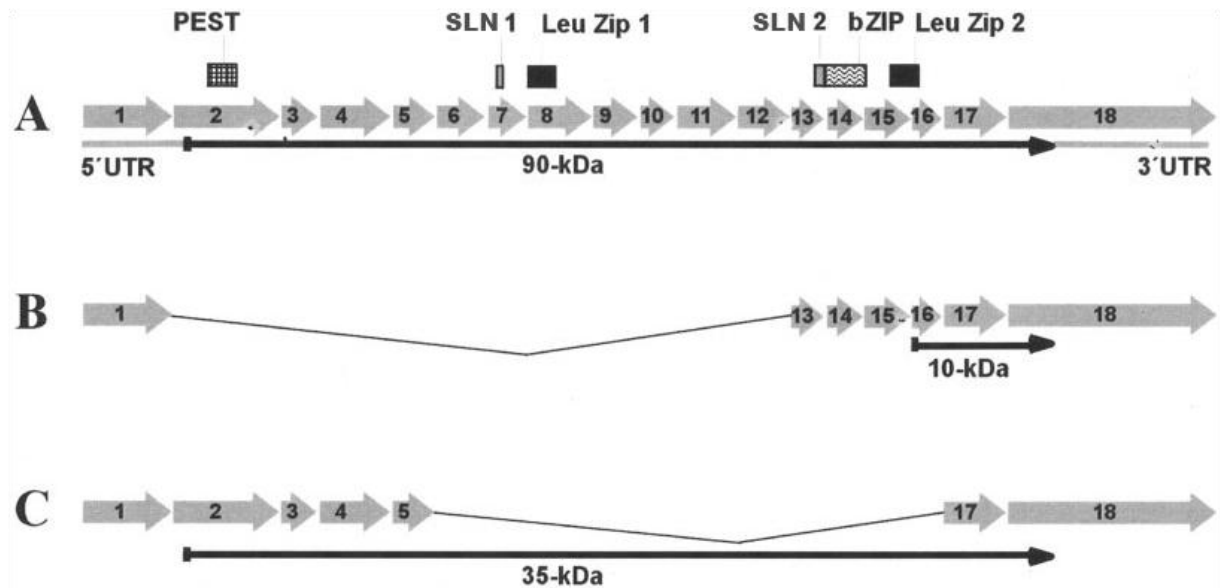
mononucleares de sangre periférica de humano (PBMCs), células de la placenta de humano y de ratón, así como también una biblioteca de cDNA de testículo de ratón, que se usó para clonar las isoformas resultantes de “splicing” alternativo. Como se observa en la **tabla 1**, la isoforma de tamaño completo codificada por 18 exones, fue la predominante en ratón y en humano, con un peso molecular de 90 kDa y con la amplificación y secuenciación de los fragmentos de PCR se obtuvieron diferentes formas de la proteína de pesos moleculares de 10, 14, 18, 35, 67 y 76 kDa. La mayoría de las estructuras previstas como las SNL, los LeuZip y dominio bZip no están presentes en estas isoformas (Lachmann et al., 2004). El “splicing” de las isoformas de 10 y 35 kDa se observan en la **figura 6**.

Tamaño del mRNA <sup>1</sup>	Exones presentes en el mRNA	Peso Molecular esperado del ORF (kDa)	Número de acceso al Gen Bank	Organismo	Tejido
2568	1-18	90	AX452708	Humano	Todos los tejidos estudiados
2552	1-18	90	AX452710	Ratón	Todos los tejidos estudiados
1160	1-5 + 17-18	35	AX452712	Humano	Placenta. PBMCs, tumor de estómago
1112	1-5 + 17-18	35	AX452714	Ratón	Placenta, embrión
983	1 + 13-18	10	AX452716	Humano	PBMCs en embarazo, tumor de útero
689	1 + 15-18	10	AX452717	Humano	PBMCs en embarazo, MCF-7
562	1-2 + 17-18	18	AY370776	Humano	Tumor de mama
578	1-2 + 17-18	1	AX452729	Ratón	Embrión, placenta
1173	1 + 9-10 + 12-15 + 17-18	14;8	AX452721	Humano	PBMCs en embarazo
1748	1-7 + 9-10 + 12 + 17-18	36	AX452727	Humano	Línea celular MCF-7
2238	1-7 + 9-15 + 17-18	36	AX452726	Humano	Línea celular MCF-7
1098	1 + 8-9 + 12-18	25	AY375528	Humano	Tumor de mama
1449	1 + 3-7 + 9-10 + 12 + 17-18	22	AX452723	Humano	Línea celular MCF-7
2144	1-11 + 15-18	76	AX452742	Ratón	Testículo
1814	1-11 + 17-18	67	AX452738	Ratón	Embrión
1643	1-11 + 18	61	AX452735	Ratón	Embrión
1169	1 + 8-14 + 17-18	36	AX452740	Ratón	Embrión
908	1-2 + 15-18	37	AX452733	Ratón	Testículo

<sup>1</sup>Tamaño del producto amplificado por PCR (nucléotidos)

**Tabla 1. Variantes de mRNA del PIBF** encontradas por RT-PCR en diferentes tejidos de humano y de ratón (Modificada de Lachmann et al., 2004).

El PIBF contiene 757 aminoácidos con una masa molecular predicha promedio de 89,724 Da y con un punto isoeléctrico teórico de 5.73. La composición de aminoácidos muestra un elevado porcentaje de ácido glutámico (14.4%), leucina (13.6%) y lisina (10.2%), con un menor porcentaje de triptofano (0.1%) y cisteína (0.8%). El análisis de hidrofobicidad indica que el PIBF es una proteína hidrofílica. Tiene una estructura general de  $\alpha$  hélice. Un análisis de la secuencia de la proteína de 90 kDa del PIBF, predijo un motivo estructural de hélice superenrollada. Se ha sugerido que las proteínas con esta característica son comunes en el material pericentriolar. Además, ciertos miembros de la familia de estas proteínas están implicados en procesos cancerígenos y se encuentran localizados en el centrosoma, donde regulan la estabilidad de los microtúbulos, afectan la morfología celular, el movimiento, así como el transporte de material intracelular (Kim & Rhee, 2011).



**Figura 6. Representación del “splicing” que experimenta el mRNA del PIBF.** El mRNA del PIBF de tamaño completo (a), y sus variantes por “splicing” encontradas en estómago (b) y en útero (c). Se indican los dominios predichos en la proteína: SLN, LeuZip, bZIP y la señal PEST (Tomado de Lachmann et al., 2004).

Estudios de inmunofluorescencia en las líneas celulares HeLa, K562 y OVCAR-3 derivadas de adenocarcinoma de cérvix, leucemia mieloide crónica y adenocarcinoma de ovario respectivamente, sugieren una interacción del PIBF con el aparato de Golgi, el centrosoma y el huso mitótico. Una purificación de los centrosomas de células embrionarias humanas de riñón (HEK293) transfectadas con un plásmido y una construcción de un vector para lograr la expresión constitutiva del PIBF, sugieren que la proteína de 90 kDa se encuentra presente en forma predominante en el área perinuclear, mientras que una de las isoformas con peso molecular de 35 kDa, se encuentra dispersa en el citoplasma (Lachmann et al., 2004), por esta dualidad en su localización, se ha sugerido que el PIBF está involucrado en la regulación del ciclo celular debido a su asociación centrosomal, y que tiene una actividad como citocina por sus isoformas secretadas en el citoplasma (Szekeres-Bartho & Polgar 2010).

La isoforma más abundante del PIBF en diversos tipos celulares es la de 90 kDa, mientras que las demás isoformas son más pequeñas y se sugiere que actúan de forma autocrina funcionando como ligando al unirse al heterocomplejo PIBF-R/IL-4R $\alpha$ , activando diversas vías de señalización (Kozma et al., 2006; González-Arenas et al., 2014).

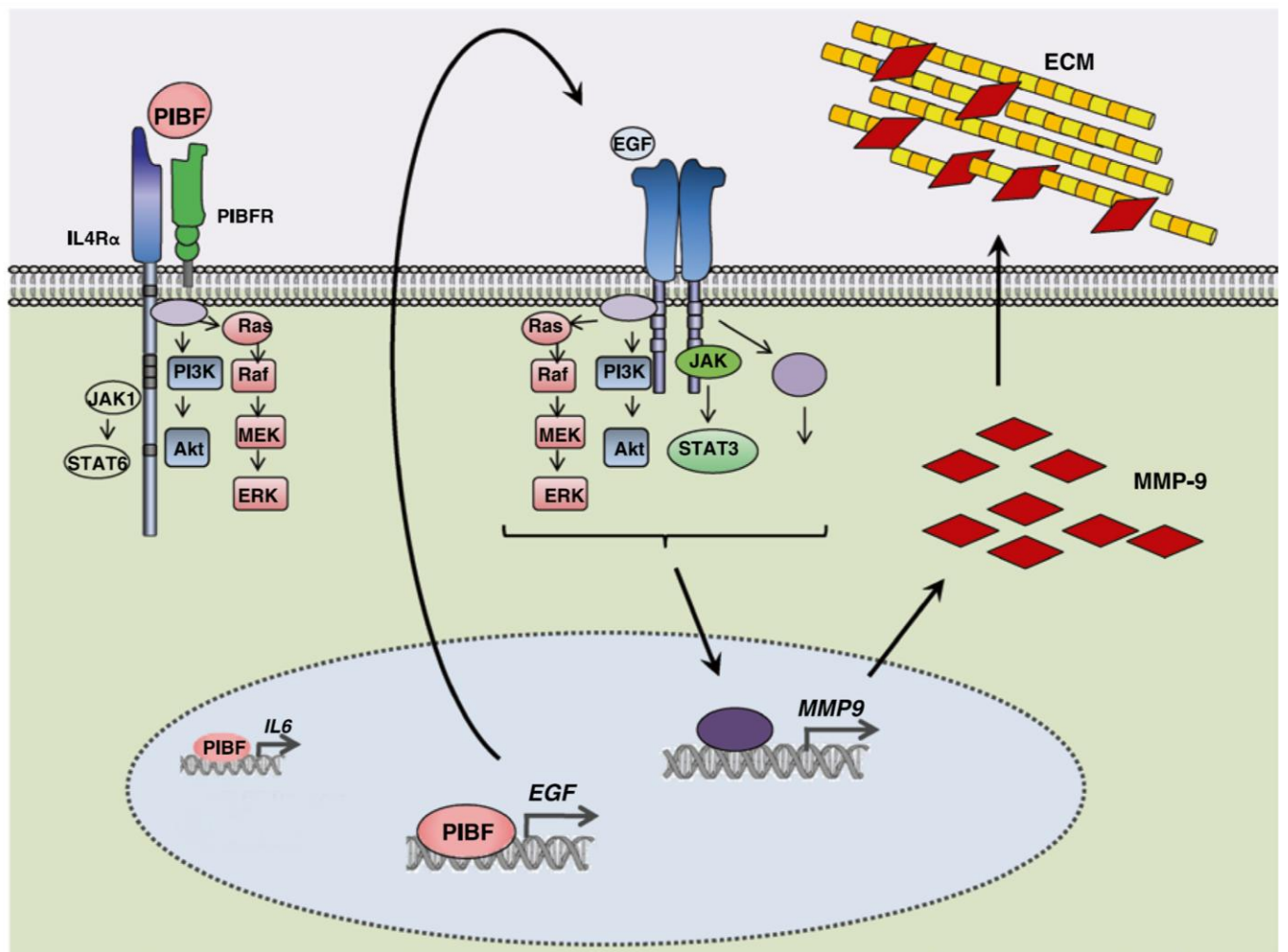
#### 2.4.2. Receptor del PIBF y receptor de Interleucina 4 (IL-4R)

El PIBF-R es una proteína que se encuentra anclada en la membrana plasmática por un grupo glicosilfosfatidilinositol (GPI) por lo que no tiene dominios intracelulares, es por esto que necesita de la unión con el receptor membranal IL-4R para que el PIBF pueda ejercer sus efectos. Las proteínas ancladas a GPI se encuentran en balsas lipídicas enriquecidas de glicoesfingolípidos-colesterol en la membrana celular. Mediante microscopía de dos fotones, se ha observado que cuando el PIBF se une con su receptor, disminuye la fluidez de la membrana al formarse agrupaciones de glicoesfingolípidos, colesterol y proteínas de membrana, que ocasionan la integración de una amplia plataforma de balsas lipídicas, lo que podría desencadenar diferentes respuestas biológicas. Estas balsas necesitan colesterol para su función, por lo que

su remoción de la membrana con metil- $\beta$ -ciclodextrina (M $\beta$ -CD) anula el efecto inducido por el PIBF (Kozma et al., 2010).

El IL-4R consiste en una cadena alfa ( $\alpha$ ) de 90 kDa y una cadena gamma ( $\gamma$ ), que parece ser la dominante involucrada en la heterodimerización en muchos tipos de células. El IL-4R es un sistema de receptor de citocina heterodimérica consistente de una cadena  $\alpha$  de alta afinidad y de una cadena de baja afinidad que puede ser la cadena  $\gamma$  o la cadena  $\alpha$ 1 del receptor de IL-3 (IL-3R). El dominio extracelular de la cadena  $\alpha$  del IL-4R proporciona casi por completo la afinidad de todo el receptor (Nelms et al., 1999).

Al unirse el PIBF al IL-4R, induce su heterodimerización con el PIBF-R, promoviendo la fosforilación del residuo de tirosina de la cadena  $\alpha$  de IL-4R y la activación de la cinasa janus 1 (JAK1) (Kiu & Nicholson, 2012), la cual fosforila los residuos de tirosina del receptor para crear sitios de acoplamiento para el transductor de señal y activador de la transcripción 6 (STAT6). Después de unirse a la cadena  $\alpha$  del IL-4R, STAT6 se convierte en el sustrato de la JAK1. La fosforilación de los residuos de tirosina localizados entre el dominio de homología Src 2 del IL-4R y el dominio de transactivación C-terminal provoca la formación de homo o heterodímeros de las proteínas STAT. Finalmente, estos dímeros se traslocan al núcleo, donde se unen a secuencias palindrómicas (secuencia consenso TTCN2-4GAA) en las regiones promotores de los genes blanco para iniciar la transcripción (Kiu & Nicholson, 2012). Se ha sugerido que el PIBF es capaz de activar la proteína STAT6 al unirse con el complejo PIBF-R/IL-4R, mecanismo mostrado en la **figura 7**, además ha sido reportado que, en linfocitos, el bloqueo del IL-4R $\alpha$  suprime los efectos del PIBF sobre la activación de STAT (Kozma et al., 2006).



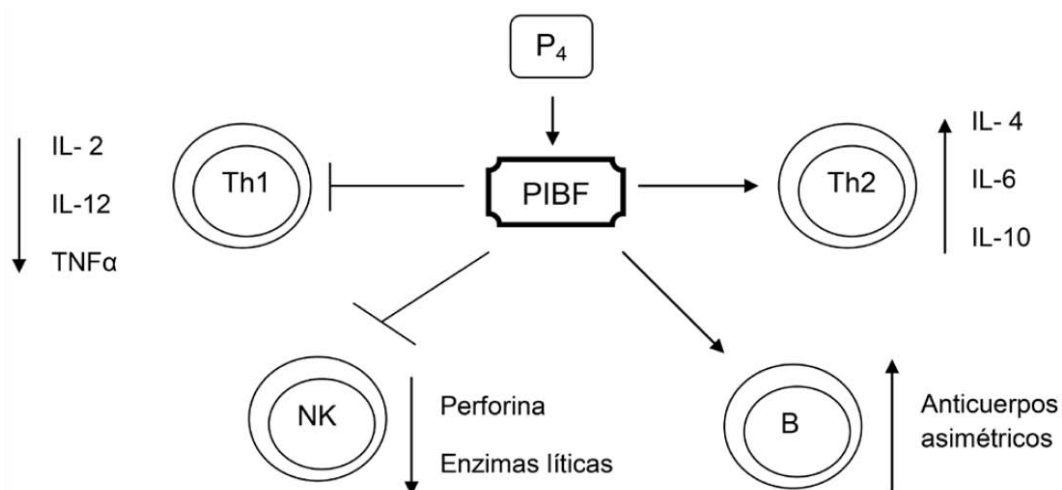
**Figura 7. Mecanismo de acción del PIBF.** A través de su unión con el complejo IL-4R $\alpha$ /PIBFR, el PIBF activa la vía Jak1 /STAT6 y otras vías de señalización como PI-3K/Akt y ERK. Además, el PIBF es capaz de entrar al núcleo donde se une a la región promotora de los genes IL-6 y EGF e induce su transcripción. El EGF expresado y secretado se une entonces a su propio receptor y activa las vías de Jak/STAT3 y PI-3K/Akt, resultando en proliferación e incremento de la expresión de MMP-9, y dando lugar al incremento de su comportamiento invasivo (ECM: Matriz extracelular) (Tomado de Halasz et al., 2013).

La vía JAK1/STAT6 está involucrada tanto en procesos de proliferación celular como en un aumento de producción de citocinas Th2. Se ha documentado extensamente el efecto inmunomodulador del PIBF durante el embarazo, al provocar una alteración en la tasa Th1/Th2, con predominio de las citocinas de linfocitos Th2 (Szekeres-Bartho et al., 1996).

### 2.4.3. El PIBF como molécula inmunomoduladora

El PIBF reduce la tasa Th1/Th2, lo que contribuye a disminuir la respuesta inmune celular. Se ha demostrado que el PIBF incrementa la producción de citocinas Th2 como IL-10, IL-3 e IL-4 *in vitro* e IL-6 *in vivo*. La expresión del PIBF en linfocitos T obtenidos del suero de mujeres embarazadas tiene una relación inversa a la concentración de TNF $\alpha$ , y en estudios *in vitro* se observa una inhibición de la expresión de IL-12 por el PIBF, obteniendo así una disminución de producción de citocinas tipo Th1 (Szekeres-Bartho et al., 1996; Luchetti et al., 2008).

Con el incremento de citocinas tipo Th2, el PIBF provoca la síntesis de anticuerpos asimétricos por los linfocitos B, debido a su estructura asimétrica, estos anticuerpos no tienen funciones efectoras, sino que funcionan como anticuerpos de bloqueo. El PIBF bloquea la lisis mediada por células NK en fibroblastos embrionarios humanos *in vitro* y en células del bazo de ratonas Balb/c embarazadas que fueron tratadas con P<sub>4</sub> (Szekeres-Bartho et al., 1985 y 1990; Kelemen et al., 1996). Este efecto del PIBF es asociado a la inhibición de la liberación de perforina de las células NK, así como también a la disminución de la desgranulación y secreción de enzimas líticas por parte de estas células (Faust et al., 1999). El resumen de los efectos inmunológicos del PIBF se observa en la **figura 8**.

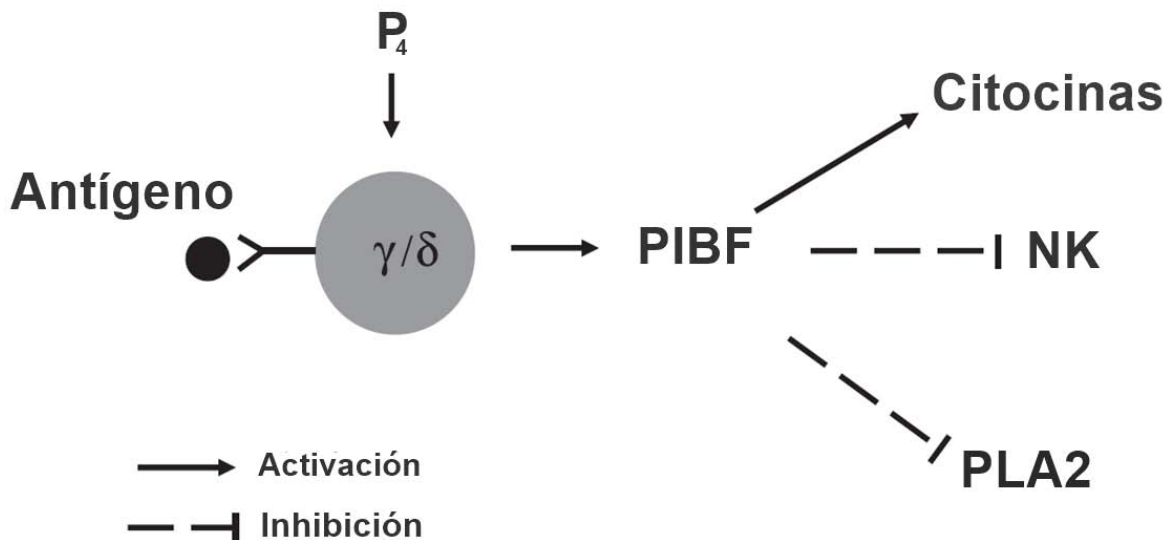


**Figura 8. Efectos inmunomoduladores del PIBF.** La P<sub>4</sub> induce la expresión del PIBF, el cual, mediante el aumento de citocinas Th2, la disminución de las citocinas



Th1, el bloqueo de la actividad de las células NK, así como la regulación de la producción de anticuerpos asimétricos no efectores por parte de las células B, disminuye la citotoxicidad celular y mantiene un estado de inmunosupresión controlado (Tomado de Gutiérrez-Rodríguez & Camacho-Arroyo, 2016).

El PIBF impide la síntesis de la prostaglandina F2 alfa (PGF2  $\alpha$ ), al inhibir a la fosfolipasa A2 (PLA2), que es la enzima que cataliza la liberación del ácido araquidónico de los fosfolípidos de membrana y que es posteriormente convertido a prostaglandinas por la enzima ciclooxigenasa 2. Al inhibirse la PGF2  $\alpha$  se reduce la producción de IL-12 y la actividad citotóxica de las células NK (Luchetti et al., 2008; Par et al., 2003), estos efectos se sintetizan en la **figura 9**.



**Figura 9. La inducción del PIBF sobre la activación de citocinas y la inhibición de las células NK y de la PLA2** (Tomado de Szekeres-Bartho & Polgar, 2010).

Aunque la producción del PIBF es un rasgo característico del embarazo normal (Szekeres-Bartho, 2002), esta molécula fue encontrada sobreexpresada en células altamente proliferativas tales como trofoblastos humanos (Anderle et al., 2008), células troncales mesenquimatosas (Kyurkchiev et al., 2011) y células derivadas de

tumores malignos (Lachmann et al., 2004) Además el PIBF activa la vía JAK-STAT, la cual ha sido relacionada con la proliferación e infiltración de los glioblastomas (Senft et al., 2011; Rahaman et al., 2002; Abou-Ghazal et al., 2008; González-Arenas et al., 2014).

### **3. Antecedentes**

#### **3.1. PIBF y glioblastomas**

Se ha especulado que los tumores malignos escapan al control inmune a través de mecanismos similares a aquellos usados por el embrión durante el embarazo (Check et al. 2009). Esos mecanismos incluyen la expresión y/o secreción de moléculas inmunomoduladoras, logrando así el crecimiento descontrolado del tumor, neoangiogénesis e invasión a tejidos adyacentes. EL PIBF es un agente inmunomodulador (Szekeres-Bartho et al. 1985), cuya expresión ha sido descrita en algunos tumores como uno de los posibles factores de la inmunidad anti-tumoral (Kyurkchiev et al., 2014).

Lachmann et al. (2004), demostraron que el PIBF se encuentra sobreexpresado en tejido tumoral de útero, mama y estómago en comparación con el tejido sano respectivo. También demostraron que las diferentes formas de la proteína son generadas por “splicing” alternativo de mRNA tanto en células normales como malignas. En investigaciones con otras líneas celulares tumorales derivadas de biopsias de cáncer de mama se encontró que el PIBF se encuentra altamente expresado al nivel del mRNA (Lachmann et al., 2004). La expresión de la proteína del PIBF también ha sido demostrada en líneas celulares derivadas de cáncer de mama, leucemia, fibrosarcoma humano y de un astrocitoma humano grado III (Lachmann et al., 2004; Srivastava et al., 2007; Check et al., 2001; Halasz, et al., 2013; González-Arenas et al., 2014)

En experimentos recientes se demostró la expresión del PIBF en células provenientes de seis biopsias de GBM humano, en donde se tomó como control el tejido sano adyacente del mismo paciente, mostrando una expresión simultánea del

PIBF en el citoplasma y el núcleo, sólo en el tejido derivado del GBM (D. Kyurkchiev et al., 2014).

En estudios realizados en nuestro laboratorio se reportó que la P<sub>4</sub> incrementa la expresión del PIBF a nivel del mRNA y de la proteína en células U251 a través del RP, por lo que la adición de su antagonista, el RU486, bloquea este efecto. Asimismo, se ha reportado que la expresión del RP correlaciona directamente con el grado de evolución de los astrocitomas, sugiriendo que los tumores positivos a RP presentan un potencial altamente proliferativo (Cabrera-Muñoz et al., 2009; Khalid et al., 1997).

Mediante una coimmunoprecipitación se pudo demostrar la asociación del PIBF con el IL-4R, debido a esta asociación, se observó que el PIBF incrementó el número de células a través de la activación de la vía de señalización IL-4R/JAK1/STAT6 (González-Arenas et al., 2014), la cual participa en el crecimiento celular tumoral (Merk et al., 2011), además se detectaron dos isoformas, una de 90 kDa y otra de 57 kDa, y mediante la técnica de inmunofluorescencia, se encontró que su expresión estaba localizada en el núcleo y citoplasma respectivamente (González-Arenas et al., 2014), tal como se había demostrado en estudios anteriores en GBM (Kyurkchiev et al., 2014).

Se ha documentado la participación del PIBF en procesos de invasión en la línea celular HT-1080 derivada de un fibrosarcoma humano, en donde se demostró que el PIBF tiene la capacidad de unirse a la región promotora de genes como IL-6 y EGF e interviene en la inducción de la fosforilación de proteínas como Akt, ERK y STAT3 que están implicadas en diversas vías de señalización relacionadas con procesos de proliferación e invasión celulares (Halasz et al., 2013) (**figura 7**). En este mismo estudio, mediante ensayos *in vivo* con un xenotrasplante de células HT-1080 con un siRNA contra el PIBF inyectadas en el saco vitelino del embrión del pez cebra, se observó que las células mostraban un menor potencial invasivo en comparación con el grupo control, lo cual sugiere que el PIBF facilita la invasión tumoral. El silenciamiento del PIBF resultó en la disminución de las metaloproteinasas de la matriz extracelular 2 y 9 (MMP-2 y MMP-9) en estas células, las cuales son enzimas

proteolíticas que provocan la degradación de los componentes de la matriz extracelular. Además, el tratamiento con el PIBF aumentó la expresión de IL-6 y ésta a su vez indujo la fosforilación en los residuos de serina 727 y tirosina 705 de STAT3, activando la vía JAK1/ STAT3, la cual se ha relacionado con la invasión celular.

Además, en estudios recientes en los que se utilizaron células JEG-3, derivadas de un coriocarcinoma humano, así como biopsias de tumores ginecológicos, el silenciamiento génico del PIBF mostró una reducción en el potencial de invasión de las células tumorales (Balassa & Polgar, 2015).

#### **4. Planteamiento del problema**

En estudios recientes en la línea celular U251 derivada de un astrocitoma humano de grado IV se sugiere que la  $P_4$  regula positivamente la expresión del PIBF a través del RP, asimismo se ha demostrado la importancia de la  $P_4$  en la proliferación, migración e invasión en las líneas celulares D54 y U251 derivadas de astrocitomas humanos grado IV. No obstante, los mecanismos por los cuales la  $P_4$  ejerce estos efectos no han sido completamente dilucidados. Se sabe que el PIBF provoca el incremento en el número de células de la línea U251 mediante la activación de la vía de señalización IL-4R/JAK1/STAT6, sin embargo, se desconoce si este factor tiene un papel importante en la proliferación, migración e invasión de células de astrocitomas humanos, procesos inducidos por  $P_4$  que pudieran estar regulados parcialmente por el PIBF.

#### **5. Hipótesis**

En líneas celulares U87 y U251, derivadas de astrocitomas humanos de grado IV o glioblastomas, el PIBF aumentará la proliferación, migración e invasión celulares.

## 6. Objetivo

### 6.1. Objetivo general

Estudiar los efectos del PIBF en la proliferación, migración e invasión en células derivadas de glioblastomas humanos.

### 6.2. Objetivos particulares

- Determinar el efecto de la  $P_4$  en la expresión del PIBF a nivel del mRNA y de la proteína, en células derivadas de un astrocitoma humano de grado IV.
- Conocer la participación del PIBF sobre el número de células y la proliferación en una línea celular derivada de un glioblastoma humano.
- Evaluar el papel del PIBF en la migración e invasión de células derivadas de astrocitomas humanos de grado IV.
- Estudiar la participación del IL-4R $\alpha$  en los procesos invasivos mediados por el PIBF, en células derivadas de un glioblastoma humano.

## 7. Metodología

### 7.1. Cultivo celular

Las líneas celulares U87 y U251 (ATCC, VA, USA) derivadas astrocitomas humanos de grado IV, se cultivaron en cajas de 10 cm con medio Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) con rojo de fenol (In vitro, S.A., D.F., México) suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10%, piruvato 1 mM, glutamina 2 mM y 0.1 mM aminoácidos no esenciales (GIBCO, NY, USA), se incubó a 37°C, en una atmósfera de 95% aire, 5% CO<sub>2</sub>. Se crecieron las células hasta alcanzar una confluencia de 70-80%, se hicieron 2 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 de fenol, suplementado con SFB al 10%, libre de hormonas, y se incubaron por 24 horas en las mismas condiciones descritas al inicio.

Para determinar el efecto de la P<sub>4</sub> en la regulación de la expresión del PIBF en la línea celular U87 a nivel del mRNA y de la proteína, se administraron a las células los siguientes tratamientos a 12 y 24 horas: 1) vehículo (Ciclodextrina 0.02%), 2) P<sub>4</sub> (10 nM), 3) RU486 (10 μM) y 4) el tratamiento conjunto de P<sub>4</sub> (10 nM) + RU486 (10 μM).

## 7.2. Extracción de RNA

Con el fin de determinar la cantidad del mRNA del PIBF obtenida después de los tratamientos mencionados anteriormente, se procedió a realizar la extracción de RNA total de las células U87, las cuales se transfirieron a un tubo eppendorf de 1.5 ml y se obtuvo un “pellet”, a la cual se añadió 1 mL de trizol (fenol e isotiocianato de guanidina; Invitrogen, CA, USA) a 4°C, las células se homogeneizaron en vórtex por 5 segundos y se mantuvieron 5 minutos en hielo. Posteriormente se agregaron 200 μl de cloroformo, se agitaron en vórtex por 15 segundos y se incubaron durante 5 minutos en hielo, a continuación, se centrifugaron a 14,000 rpm por 15 minutos a 4°C. Una vez transcurrido el tiempo centrifugación se obtuvieron dos fases: Una inferior de color rojo, que está compuesta por fenol-cloroformo y en la cual se encuentran las proteínas; y la superior, una fase acuosa incolora, en la que se encuentra el RNA, mientras que en la interfase se mantuvo el DNA.

A continuación, se transfirió la fase acuosa a otro tubo eppendorf de 1.5 ml, al que se añadió isopropanol en un volumen 1:1 con la fase acuosa y las muestras se dejaron precipitar toda la noche a 4°C. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 14.000 rpm durante 15 minutos a 4°C, de lo cual se obtuvo un “pellet” de color amarillo, se les retiró el sobrenadante por decantación y se realizó un lavado con 1 ml de etanol al 75% en agua con DEPC (dietil pirocarbonato) al 0.1%, después se agitaron en vórtex durante 5 segundos y se centrifugaron a 12,000 rpm durante 8 minutos a 4°C, a continuación se decantó el sobrenadante y se repitió el proceso de lavado pero ahora con etanol al 80% en agua con DEPC, se eliminó todo el sobrenadante y se dejó secar “el pellet” formado en cada muestra. Finalmente, el RNA se resuspendió en 30 μl de agua con DEPC.

El RNA extraído se cuantificó mediante el uso del espectrofotómetro Nanodrop-2000 (Thermo Scientific) a 280 y 260 nm.

### *7.3. Retrotranscripción (RT)*

Para la síntesis de la primera hebra de cDNA, se agregaron los siguientes componentes en un tubo eppendorf: 1 µL de oligo (dT)<sub>12-18</sub> (500 µg/ml; Invitrogen), 1 µg de RNA total, 1 µl de dNTPs (10 mM de cada dATP, dGTP, dCTP y dTTP a pH neutro) y agua destilada estéril (el volumen necesario para tener un total de 12 µl), la mezcla se incubó durante 5 minutos a 65 °C y después se mantuvo por 1 minuto en hielo.

A continuación, se añadieron 4 µl de amortiguador de reacción 5X (Thermo Scientific), 2 µL de DTT (0.1 M), se mezcló levemente y se incubó por 2 minutos a 37°C. Posteriormente se añadió 1 µl (200 unidades) de M-MLV RT (Thermo Scientific). Se incubó por 50 minutos a 37 °C y se inactivó la reacción calentando por 15 minutos a 70°C.

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

Para la reacción de amplificación del gen del PIBF y del RNA ribosomal 18S, el cual fue utilizado como control interno, se utilizaron los siguientes oligos específicos:

Para la amplificación del fragmento del PIBF, se utilizó el oligo sentido con secuencia 5'- GACAGAGCCAATTCGCTATTAACCACTCAACAGC -3' y en el antisentido la secuencia fue 5'- GCTGAGTACACGATTAAGCTGAATTTTGTTCATCAG -3'; y para la amplificación de la región del 18S los oligos utilizados fueron: 5'- CGCGGTTCTATTTTGTGGT -3' en el sentido y 5'- AGTCGGCATCGTTTATGGTC -3' en el antisentido (Sigma–Aldrich, MO, USA).

Los 25 µl de la reacción de PCR incluyó: 2 µl del cDNA sintetizado previamente, 2,5 µl de amortiguador de reacción 10X (100 mM Tris-HCl pH 8.4; 500 mM KCl; 100 µg/ml gelatina, 1.5 mg/ml BSA; 1% Tritón X100), 1.25 µl de cloruro de magnesio (30 mM), 2 µl de dNTPs (10 mM de cada dATP, dGTP, dCTP y dTTP a pH neutro), 15 µl

de cada oligo, 0.5  $\mu$ l (5 unidades) de la Amplificasa DNA polimerasa termoestable y agua destilada estéril (el volumen necesario para tener un total de 25  $\mu$ l).

Se realizó una incubación inicial de la reacción de 5 minutos a 94°C para asegurar la completa desnaturalización del cDNA. Posteriormente se efectuaron 25 ciclos de amplificación para el PIBF y el 18S con las siguientes condiciones: 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 68°C, 30 segundos a 72°C. La etapa de extensión final se llevó a cabo durante 5 minutos a 72°C.

Los productos de la amplificación se analizaron por electroforesis de las muestras en geles de agarosa al 1.5% y se observaron en un transiluminador de rayos UV. Se utilizó una cámara digital Kodak DC290 Zoom para obtener la imagen digital de las bandas observadas en cada gel. La intensidad de las bandas del PIBF y del 18S fue cuantificada por densitometría usando el programa ImageJ (National Institute of Health, WA, USA). Los niveles de la expresión del gen fueron normalizados con los del 18S.

### *7.5. Extracción de proteínas*

Para determinar el contenido del PIBF en la línea celular U87 después de los tratamientos mencionados en el apartado 6.1., se realizó extracción de proteínas, lisando las células por medio del buffer de lisis RIPA, con una mezcla de inhibidores de proteasas [Tris-HCl 50 mM pH 7.5, NaCl 150 mM, Nonidet P-40/Tritón 1%, desoxicolato de sodio 0.5%, SDS 0.1%, ácido etilendiamino tetraacético (EDTA) 1 mM, Amino etil bencenil solfonil fluoruro (AEBSF) 2 mM, bestatina 130  $\mu$ M, aprotinina 0.3  $\mu$ M, E-64 14  $\mu$ M, leupeptina 1  $\mu$ M y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 100  $\mu$ g/ml] a 4°C y se incubaron durante 1 hora en hielo. Para asegurar el completo lisado de las células, se hicieron pasar las muestras a través de una aguja de 21G x 32 mm. Posteriormente se centrifugaron a 14,000 rpm a 4°C por 15 minutos, el sobrenadante se separó para almacenarse a 4°C en tubos eppendorf de 1.5 ml para después proceder a su cuantificación y separación de las proteínas mediante electroforesis. La concentración de proteínas se determinó espectrofotométricamente a 280 nM en un Thermo Scientific NanoDrop.



## 7.6. Western Blot

Las muestras de proteína obtenidas del lisado de las células (70 µg) se mezclaron con buffer de Laemmli 2X (Tris-base pH 6.8, glicerol al 20%, SDS al 4%, azul de bromofenol al 0.1% y mercaptoetanol al 10%), en una relación proteína-buffer del 2:1 y se hirvieron durante 10 minutos. Las proteínas se separaron por electroforesis en condiciones desnaturizantes, depositándolas en geles de poliacrilamida al 7.5% a 75 V por aproximadamente 2 horas, marcadores de peso molecular (Bio-Rad, Ca, USA) fueron incluidos para la determinación del peso.

Las proteínas en los geles fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa (Millipore, MA, USA) a 60 mA por 2 horas a temperatura ambiente en condiciones semihúmedas. Las membranas fueron bloqueadas con 3% de leche baja en grasa y 2% de albúmina sérica bovina (In vitro, S.A., D.F., México) en TBS-tween 0.1% a 4°C durante toda la noche.

Las membranas se incubaron con el anticuerpo anti-PIBF (Anticuerpo policlonal sc-99129, Santa Cruz Biotechnology, TX, USA) en una dilución 1:200 (1 µg/ml) en TBS-tween al 0.05%, durante toda la noche a 4°C. Al finalizar la incubación se hicieron 3 lavados de 5 minutos con TBS-tween 0.1% y después se incubaron con un anticuerpo secundario anti-conejo conjugado a peroxidasa (IgG-HRP, sc-2004, Santa Cruz Biotechnology, TX, USA) en una dilución de 1:5000 durante 45 minutos a temperatura ambiente (0.2 µg/ml). Se realizaron 3 lavados más de 5 minutos con TBS-tween 0.1%. Para la determinación de la proteína de interés se utilizó el método de detección de alta sensibilidad SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity (Thermo Scientific). La señal de quimioluminiscencia, resultado de la reacción del peróxido con la peroxidasa acoplada al anticuerpo secundario, fue detectada al exponer las membranas a placas autoradiográficas (Carestream Kodak Biomax, Sigma-Aldrich, USA),

Para normalizar las diferencias en cuanto a cantidad de proteína depositada en los pozos, se realizó la determinación de  $\alpha$ -tubulina, la membrana se incubó 30 minutos con glicina a pH 2.5 seguido de un bloqueo por 2 horas y media a 37 °C utilizando la solución de bloqueo con la concentración que se utilizó anteriormente y se incubó

con el anticuerpo primario anti  $\alpha$ -tubulina (sc-5286, Santa Cruz Biotechnology, TX, USA) en una dilución 1:1000 (0.5  $\mu\text{g/ml}$ ) durante toda la noche a 4°C. Posteriormente se incubó con el anticuerpo secundario, el cual fue anti-ratón conjugado a peroxidasa (IgG-HRP, sc-2005, Santa Cruz Biotechnology, TX, USA) en una dilución de 1:5000 durante 45 minutos a temperatura ambiente (0.2  $\mu\text{g/ml}$ ). Al finalizar su incubación se determinó la quimiolumiscencia de la manera descrita para el anticuerpo primario contra el PIBF.

Se utilizó una cámara digital Kodak DC290 Zoom para obtener la imagen digital de las bandas observadas en cada placa. La intensidad de las bandas del PIBF y de la  $\alpha$ -tubulina fue cuantificada por densitometría usando el programa ImageJ (National Institute of Health, WA, USA). Los niveles de la expresión de la proteína fueron normalizados con los de la  $\alpha$ -tubulina.

#### *7.7. Conteo celular*

Con la finalidad de evaluar el efecto del PIBF en el número de células derivadas de astrocitomas humanos de grado IV, 10,000 células U87 se sembraron en cajas de 24 pozos y se dejaron crecer por 24 horas, posteriormente el medio se cambió a DMEM sin rojo de fenol y libre de hormonas. Las células fueron tratadas por 5 días, en los que se adicionaron los siguientes tratamientos: PIBF recombinante (rPIBF) (Abnova, Taipei, TWN) 100 y 200 ng/ml, y se dejaron también células sin tratamiento. Los conteos celulares iniciaron el primer día de tratamiento y finalizaron el quinto día de tratamiento, haciendo uso de sus propiedades adherentes dependientes de calcio, las células se despegaron cada día usando PBS-EDTA. Posteriormente se empleó el método de tinción por exclusión con azul de tripano para medir el efecto del PIBF en el crecimiento y viabilidad celulares, se utilizó una cámara Neubauer y un microscopio invertido Olympus CKX41 (Olympus, TYO, JPN) a una amplificación de 40X.

#### *7.8. Ensayo de proliferación celular*

Para conocer si el aumento de células U87 se debía a un aumento en la proliferación celular, se realizó un ensayo de incorporación de 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU). 4,

000 células U87 se sembraron en cámaras de cultivo con separaciones y se mantuvieron como se describe en el apartado 6.1. Pasadas 24 horas el medio se cambió por DMEM libre de hormonas y rojo de fenol y las células se trataron con rPIBF durante 4 días con 100 ng/ml, que fue la mínima concentración que causó el efecto de aumento en número de células. Después del tratamiento se utilizó el Kit de detección y marcado de 5-bromo-2'-desoxiuridina, (BrdU) (Roche, BW, DE) de acuerdo a las indicaciones del fabricante. El colorante fluorescente Hoechst 33342 se utilizó para marcar el DNA. La señal de fluorescencia se observó a longitudes de onda de 486 y 515-565 nm con la ayuda del microscopio de fluorescencia Olympus Bx43F (Olympus, TYO, JPN). El número de células que incorporaron el BrdU se calcularon empleando el programa Image J (NIH, WA, USA), el porcentaje de células positivas para BrdU se calculó considerando el número total de células marcadas con Hoechst.

### *7.9. Ensayo de migración*

Para determinar el efecto del PIBF sobre la migración de las células U87 y U251 se utilizó el ensayo de herida. Se sembraron 200,000 y 300,000 células U251 y U87 respectivamente y cuando la monocapa celular se encontraba completamente confluyente, las células fueron lavadas con PBS, después se les agregaron 500  $\mu$ l de PBS-EDTA (1 mM) a cada pozo e inmediatamente, con una punta de pipeta desechable de 200  $\mu$ l, se obtuvo una estría en la monocapa de células. Posteriormente, se realizó 1 lavado con PBS para eliminar a las células desprendidas. A continuación, se colocaron 2 ml de medio DMEM sin rojo de fenol y SFB sin hormonas con la adición de clorhidrato de citosina  $\beta$ -D-arabinofuranósido (Ara-C, inhibidor de la síntesis de DNA) a una concentración final de 10  $\mu$ M y se incubaron durante 1 hora a 37°C. Sin retirar el medio, se adicionaron los siguientes tratamientos: rPIBF (Abnova, Taipei, TWN) 100 y 200 ng/ml, mientras que células sin tratamiento se dejaron solo con el medio. Se tomaron fotografías con una cámara Infinity1-2C acoplada a un microscopio invertido Olympus CKX41 a un aumento de 10X de la zona de "Scratch" a las 0, 3, 6, 12, 24 y 48 horas después del tratamiento. A las 24 horas el medio y los tratamientos se reemplazaron por medio y tratamientos frescos.

### 7.10. Ensayo de invasión

Para evaluar el efecto del PIBF en la invasión de las células U87 y U251 se realizó el ensayo de invasión “transwell”. Se cultivaron las células como se indica en el apartado 6.1., y se descongeló el gel de ECM (Sigma-Aldrich, USA) durante toda la noche a 4°C, al llegar a una confluencia de 80-90% a las células se les reemplazó el medio por DMEM sin rojo adicionado con SFB al 10% libre de hormonas y se realizó una dilución del gel ECM con medio DMEM sin rojo de fenol y sin SFB a una concentración final de 2 mg/ml. Se colocaron los insertos (Corning, USA) en cajas de cultivo de 6 pozos, estos insertos contienen en el fondo una membrana de policarbonato con poros de 8 µm de diámetro. A continuación, se colocó 1 ml de ECM en cada inserto. Se incubaron las cajas que contenían los insertos durante 24 horas a 37 ° C para permitir la gelificación. Transcurrido este tiempo, las células se lavaron con 2 ml de PBS y posteriormente se despegaron con 1 ml de PBS-EDTA, las células se resuspendieron en medio DMEM sin rojo de fenol y sin SFB, y se sembraron 300,000 y 400,000 células U251 y U87 respectivamente por inserto en 1.5 ml del mismo medio. Se adicionó rPIBF a una concentración de 100 ng/ml, mientras que se utilizó el medio como vehículo y se adicionó clorhidrato de citosina β-D-arabinofuranósido (Ara-C, inhibidor de la síntesis de DNA) a una concentración final de 10 µM. Se colocaron 2 ml de medio DMEM sin rojo de fenol suplementado con SFB al 10% libre de hormonas en los pozos para que funcionara como quimioatrayente.

La placa se incubó durante 24 horas a 37 °C. Transcurrido el tiempo se eliminó el medio y el gel de ECM del inserto y se realizó un lavado con PBS. Se fijaron las células con paraformaldehído (PFA, 4%) por 20 minutos. Para quitar el excedente de PFA se realizó un lavado con PBS por 5 minutos. Las células se tiñeron con cristal violeta al 1% durante 15 minutos y posteriormente se hicieron tres lavados con PBS por 10 minutos cada uno. Se dejó secar el inserto y se observó al microscopio, se tomaron las fotografías correspondientes con una cámara Infinity1-2C acoplada a un microscopio invertido Olympus CKX41 a un aumento de 10X. Para cuantificar el número de células invasoras en la membrana, que fueron aquellas que atravesaron el Matrigel, se contaron en 5 campos tomados al azar.

### *7.11. Silenciamiento génico mediante siRNAs*

Con el objetivo de determinar la especificidad de las bandas del PIBF obtenidas por WB, así como conocer la participación del IL-4R $\alpha$  en los procesos invasivos mediados por el PIBF, se realizó el silenciamiento de la expresión génica del PIBF y del IL-4R $\alpha$ . Las células U87 fueron cultivadas como se menciona en el apartado 6.1., sin la adición de antibióticos. La confluencia alcanzó un 50% al momento de la transfección, que se realizó 24 horas después del cultivo celular, el medio fue remplazado con medio DMEM sin rojo de fenol, sin antibióticos y sin SFB. En tubos eppendorf de 1.5 ml se adicionaron los siguientes componentes en 200  $\mu$ l: Lipofectamine<sup>TM</sup> RNAiMAX (Thermo Scientific, MA, USA), que se utilizó como el agente de transfección, un siRNA control, que no contenía ninguna secuencia blanco específica (sc-44236, Santa Cruz Biotechnology, TX, USA), y siRNA PIBF (sc-61347, Santa Cruz Biotechnology, TX, USA) o siRNA IL-4R $\alpha$  (sc-35661, Santa Cruz Biotechnology, TX, USA). Los siRNA contra el PIBF y el IL-4R $\alpha$  se utilizaron a una concentración final de 25, 50 y 75 nM, 6 horas después de la transfección el medio se cambió a DMEM sin rojo adicionado con SFB sin hormonas, para comprobar que se haya producido el silenciamiento se realizó un RT-PCR para el PIBF, siguiendo el procedimiento señalado en los apartados 6.3. y 6.4, y posteriormente se llevó a cabo un WB para muestras silenciadas para uno u otro gen, siguiendo el procedimiento mencionado en el apartado anterior.

### *7.12. Análisis estadístico*

Los análisis anteriores se realizaron utilizando el programa GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Inc., USA) para calcular los valores de probabilidad. Los datos obtenidos en el análisis densitométrico del Western Blot, se sometieron a un análisis estadístico a través de la prueba de ANOVA de una vía, mientras que, para el conteo de células del ensayo de migración, así como el conteo celular se utilizó una prueba ANOVA de dos vías, ambos análisis fueron seguidos de la prueba Bonferroni para efectuar la comparación de cada tratamiento con el vehículo o control respectivo. Los datos obtenidos en el análisis densitométrico del RT-PCR, el ensayo de proliferación y el conteo de células del ensayo de invasión, se analizaron

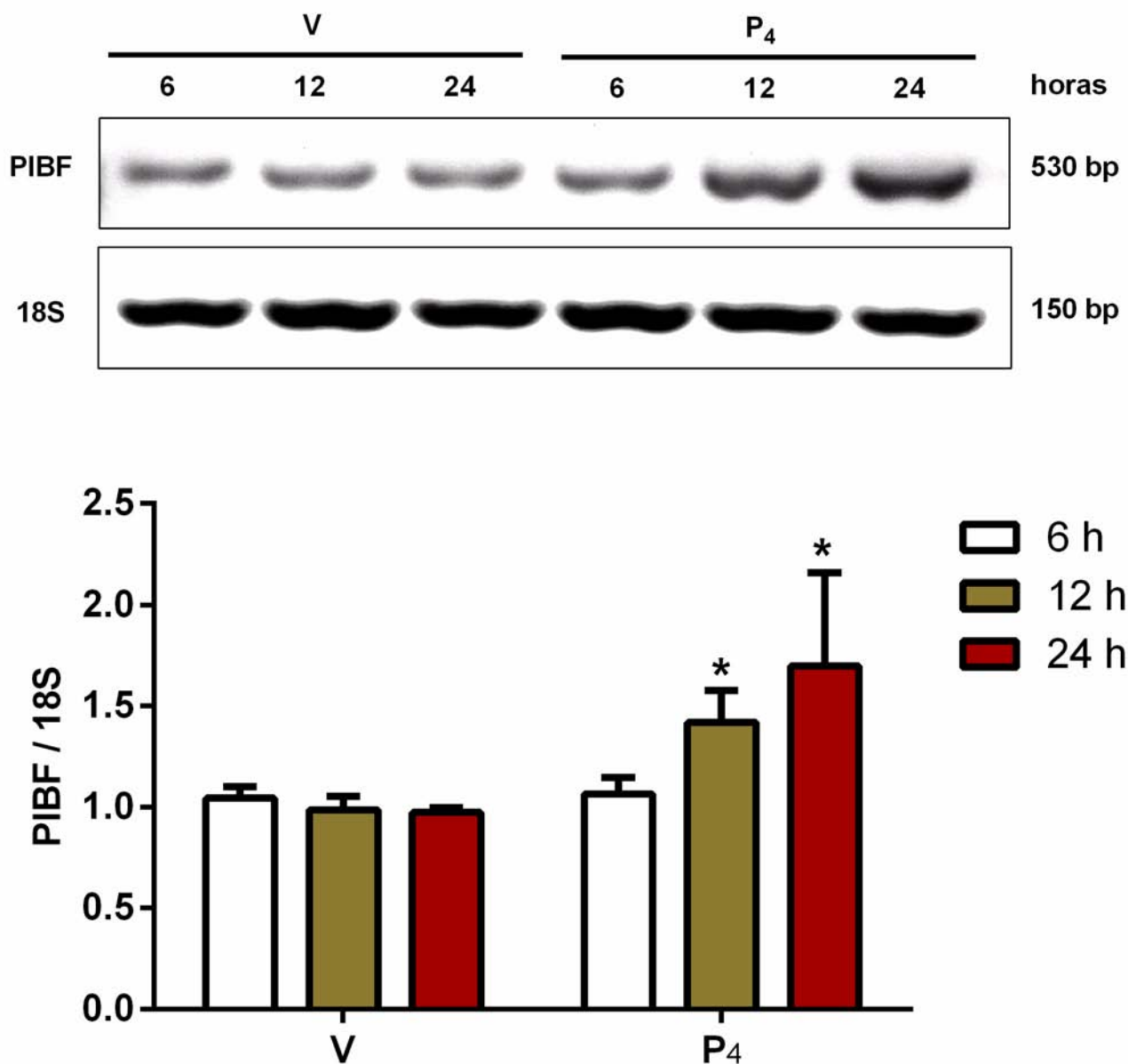
mediante una prueba de T de Student. En todas las pruebas estadísticas el intervalo de confianza fue del 95% por lo que se consideraron estadísticamente significativos aquellos datos que tuvieron un valor de  $p < 0.05$ .

## 8. Resultados

### *8.1. Expresión del PIBF a nivel del mRNA en la línea celular U87 y su regulación por la $P_4$*

Para evaluar si el PIBF se expresa en la línea celular U87 y para conocer si este factor se regula por  $P_4$ , se realizó un ensayo de RT-PCR con RNA extraído de células tratadas con vehículo (ciclodextrina al 0.02%) y con  $P_4$  (10 nM). Los tratamientos administrados se decidieron considerando un trabajo previo realizado en nuestro laboratorio donde se demostró que en las células U373 derivadas de una astrocitoma humano grado III (ahora conocidas como U251 después de un genotipificación por STR-PCR), la  $P_4$  inducía la expresión del PIBF a una concentración de 10 nM tanto a nivel del mRNA como de la proteína (González-Arenas et al., 2014). Los tratamientos se mantuvieron por 6, 12 y 24 horas. Se logró una amplificación de un fragmento de 530 pb, lo cual indica la presencia de este factor en las células U87. También se amplificó un fragmento de 150 pb correspondiente al control de carga, el rRNA 18 S.

Como se indica en la **figura 10**, la expresión del mRNA del PIBF en las células U87 no se modifica significativamente a las 6 horas de tratamiento con  $P_4$  sin embargo, a partir de las 12 horas se observó un incremento significativo de la expresión del PIBF, el cual se mantiene hasta las 24 horas.



**Figura 10. Regulación del mRNA del PIBF por la P<sub>4</sub> en las células U87.** La expresión del PIBF en las células U87 fue obtenida mediante el ensayo de RT-PCR. Las células fueron tratadas con vehículo (V) (ciclodextrina al 0.02%) y P<sub>4</sub> (10 nM), durante 6, 12 y 24 horas. En el panel superior se puede observar una imagen representativa de la expresión del mRNA del PIBF (530 pb) a los diferentes tiempos de tratamiento, así como los respectivos controles de expresión 18S (150 pb). En el panel inferior se muestran la gráfica obtenidas de tres experimentos independientes, después del análisis densitométrico de la expresión del PIBF, el cual fue corregido con los valores de mRNA del RNA ribosomal 18S. Los resultados son expresados como media  $\pm$  S.D. (\*)  $p < 0.05$  comparado con el V.

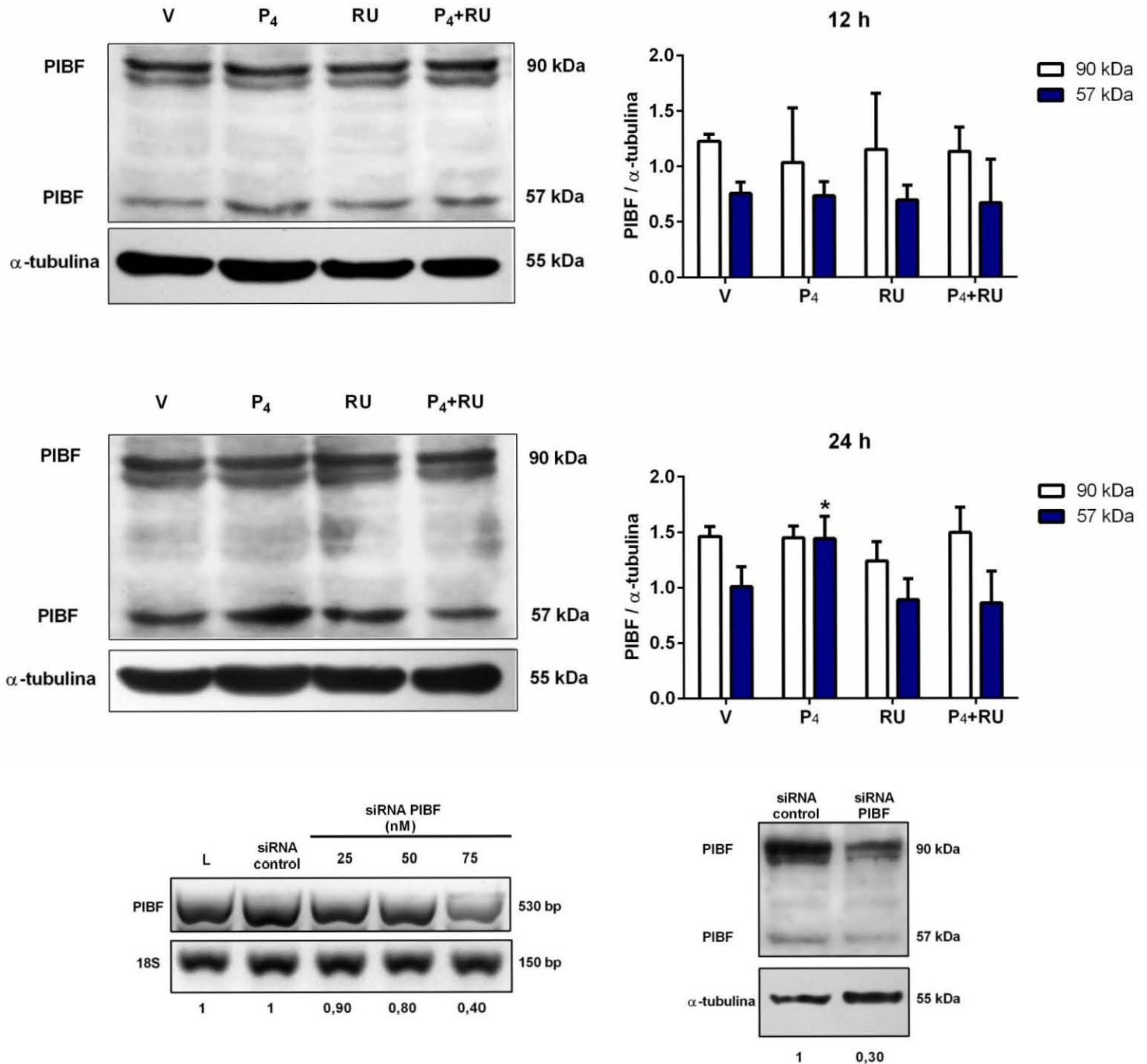
## *8.2. Expresión del PIBF a nivel de la proteína en la línea celular U87 y su regulación por la P<sub>4</sub>*

En el mRNA del PIBF se lleva a cabo un proceso de “splicing” alternativo, resultando en diversas isoformas de este factor, la isoforma de 90 kDa es la que se encuentra principalmente sobreexpresada en cáncer, sin embargo, las demás de menor tamaño no han sido completamente caracterizadas y son tejido-específicas. Debido a esto se tuvo como objetivo determinar cuáles isoformas del PIBF resultantes de este proceso se expresaban en la línea celular U87, asimismo se evaluó su regulación por P<sub>4</sub>. Para lograr este objetivo se detectó esta proteína por medio de la técnica de Western Blot. Los tratamientos administrados se decidieron tomando en cuenta un trabajo previo del laboratorio (González-Arenas et al., 2014). Como indica la **figura 11**, se detectó la presencia del PIBF a nivel de la proteína (90 y 57 kDa) en la línea celular U87. La isoforma de tamaño completo fue la que se encontró de forma más abundante. Se puede advertir en las gráficas de la **figura 11** que la P<sub>4</sub> no indujo la expresión del PIBF a las 12 horas en ninguna de las dos formas de la proteína, mientras que a las 24 horas se observa una inducción de la isoforma de 57 kDa del PIBF con el tratamiento de P<sub>4</sub>, mientras que el RU486 bloqueó por completo esta inducción, lo cual indica que este aumento de la expresión se debe a la activación del mecanismo clásico por la interacción de la P<sub>4</sub> con el RP. De forma interesante, se pueden apreciar dos bandas que se encuentran cerca del peso molecular esperado de 90 kDa, el gen que codifica para esta isoforma contiene varios posibles sitios de modificación postraducciona que pueden explicar este hallazgo.

Con la finalidad de conocer si la inmunodetección de las isoformas del PIBF fue específica, se realizó un ensayo de silenciamiento génico con siRNAs. Se utilizó Lipofectamina<sup>TM</sup> RNAiMAX, como agente de transfección, un siRNA control dirigido a una secuencia no específica, así como un siRNA específico contra el PIBF, el silenciamiento se comprobó mediante los ensayos de RT-PCR y WB. En la **figura 11** se aprecia una imagen representativa de la expresión del PIBF a nivel de mRNA y de la proteína con los distintos tratamientos. Se observa una disminución de un 60%



a nivel del mRNA con la máxima concentración utilizada, lo que se vio reflejado en la disminución del contenido de ambas isoformas en aproximadamente un 70% con esta misma concentración, lo que indica la especificidad de las bandas reconocidas por el anticuerpo utilizado.

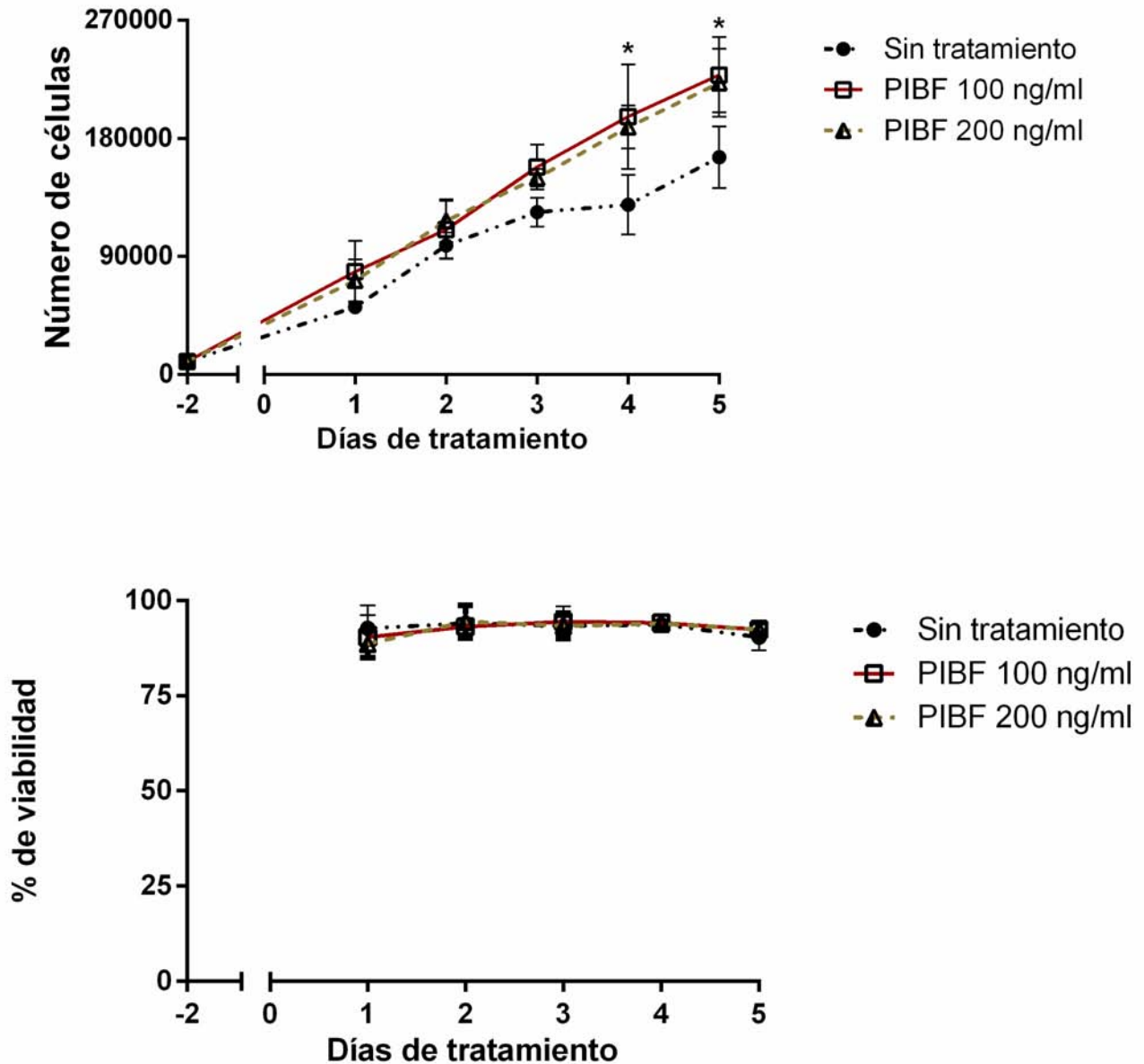


**Figura 11. Regulación del PIBF a nivel de proteína por la P<sub>4</sub> en las células U87.** La expresión del PIBF en las células U87 fue analizada mediante Western Blot. Las

células fueron tratadas con vehículo (V) (ciclodextrina al 0.02%), P<sub>4</sub> (10 nM), RU486 (RU) (10 μM) y P<sub>4</sub>+RU486, durante 12 y 24 horas. En el panel superior y medio de la izquierda se pueden observar las imágenes representativas de la expresión del PIBF en su forma completa (90 kDa) y una de las isoformas (57 kDa) a los distintos tiempos de tratamiento, así como los respectivos controles de expresión (α-tubulina, 55 kDa). En el panel superior y medio de la derecha se muestran las gráficas obtenidas de cuatro experimentos independientes, después del análisis densitométrico de la expresión del PIBF, el cual fue corregido con los valores de la α-tubulina. Los resultados son expresados como media ± S.D. (\*) p < 0.05 comparado con los otros grupos. En los paneles inferiores izquierdo y derecho se observan imágenes representativas de la reducción de expresión a nivel del mRNA y a nivel de la proteína de ambas isoformas del PIBF, respectivamente. El nivel de expresión se analizó mediante los ensayos de RT-PCR y WB y fue corregido con sus respectivos controles de expresión (rRNA 18 S y α-tubulina respectivamente).

### *8.3. Efecto del PIBF sobre el número de células en la línea celular U87.*

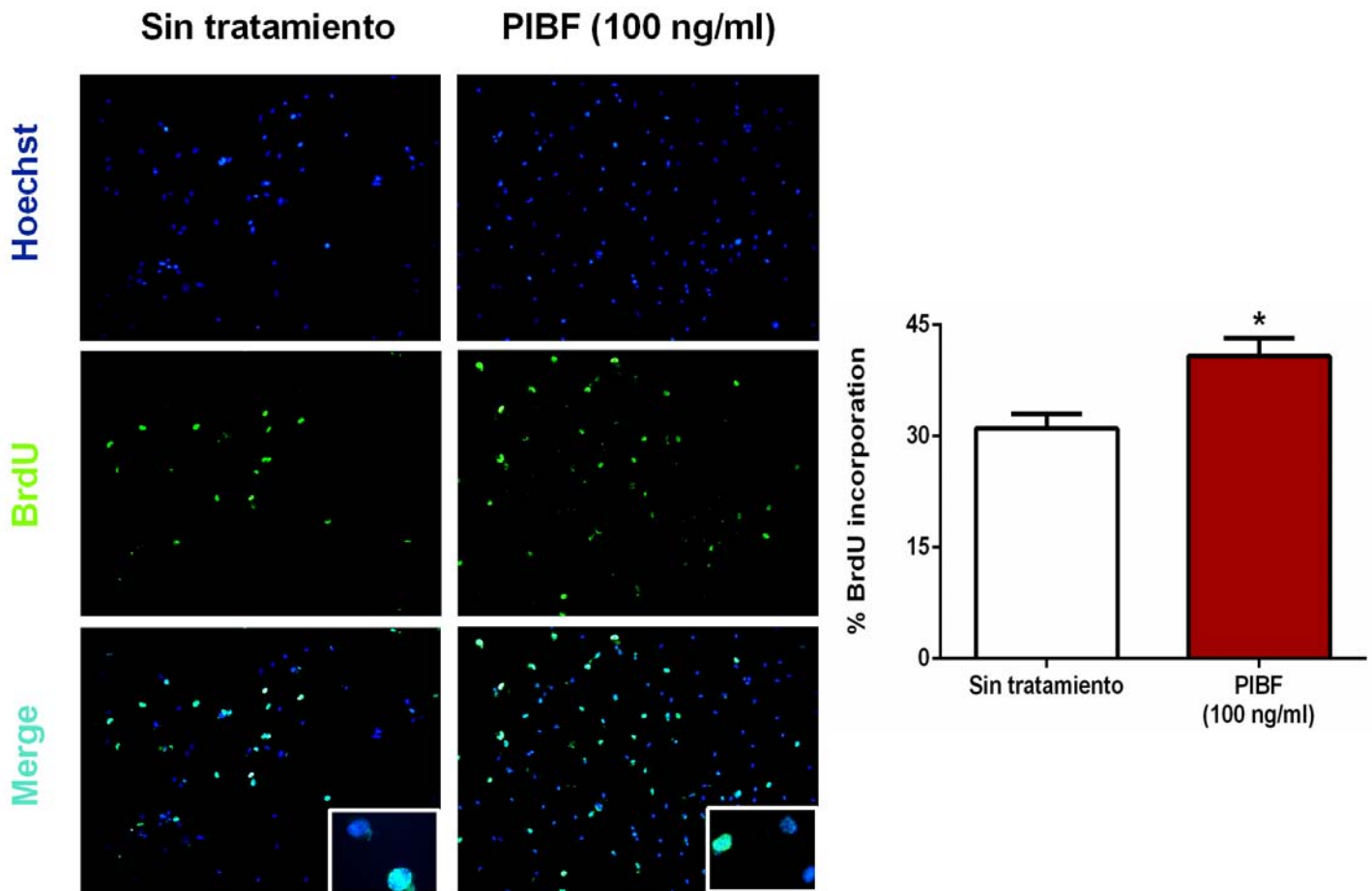
Una señal de proliferación constitutiva, la evasión de supresores de crecimiento y la resistencia a la muerte celular son parte de los “hallmarks” del cáncer que tienen como consecuencia un aumento desregulado del número de células (Hanahan & Weinberg 2011). Con el objetivo de conocer si el PIBF ejerce un efecto de aumento de células U87 derivadas de un astrocitoma humano de grado IV, incremento observado con este tratamiento en células derivadas en la línea celular U251 (antes conocida como U373) derivada de un astrocitoma humano, se realizaron conteos celulares desde el primero hasta el quinto día de tratamiento. Se utilizó el método de tinción por exclusión con azul de tripano, obteniendo de esta manera también la viabilidad celular. Como se observa en la **figura 12**, el tratamiento con ambas concentraciones del rPIBF (100 y 200 ng/ml) incrementaron de forma significativa el número de células a partir del día 4 de su administración y los tratamientos no tuvieron ningún efecto en la viabilidad celular, lo que indica que ninguna concentración del rPIBF ocasiona toxicidad celular que pudiera estar afectando diversos procesos en la progresión tumoral de estas células.



**Fig. 12. Efecto del PIBF sobre el número de células U87.** Las células fueron tratadas con rPIBF (100 y 200 ng/ml) por 5 días, se despegaron y contaron a partir del día 1 de tratamiento. Se utilizó el método tinción por exclusión con azul de tripano para medir el aumento en número de células (panel superior) y la viabilidad celular (panel inferior). Las gráficas se obtuvieron de tres experimentos realizados de forma independiente. Los resultados son expresados como media  $\pm$  S.D. (\*)  $p < 0.05$  comparado las células sin tratamiento.

#### *8.4. Papel del PIBF en la proliferación de células U87 derivadas de un glioblastoma humano*

Para conocer si el aumento de células era ocasionado por un incremento en la proliferación celular, y no por otro de los “hallmarks” del cáncer, se realizó un ensayo de incorporación del análogo de la timidina, 5-bromo-2’ desoxiuridina (BrdU), el cual al fosforilarse se incorpora a la nueva cadena de DNA que se está sintetizando. Se lleva a cabo un marcaje de la molécula de BrdU, posteriormente se adicionan anticuerpos primarios que reconozcan esta marca y a continuación se añaden anticuerpos secundarios acoplados a fluoróforos, para ser detectados empleando la técnica de inmunofluorescencia. EL tratamiento con el rPIBF se decidió tomando en consideración la concentración mínima que causó el aumento en el número de células (100 ng/ml) y se mantuvo hasta el día 4, en el que se observó la diferencia significativa en comparación con las células no tratadas. Como se puede observar en la **figura 13**, el rPIBF (100 ng/ml) aumentó el porcentaje de células que incorporaban BrdU (30%) lo que indica que el incremento en el número de células se debe principalmente a un aumento en la proliferación.

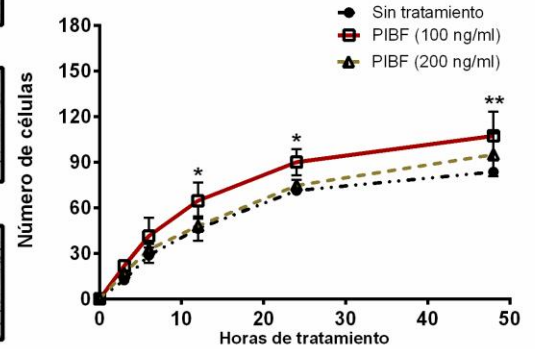
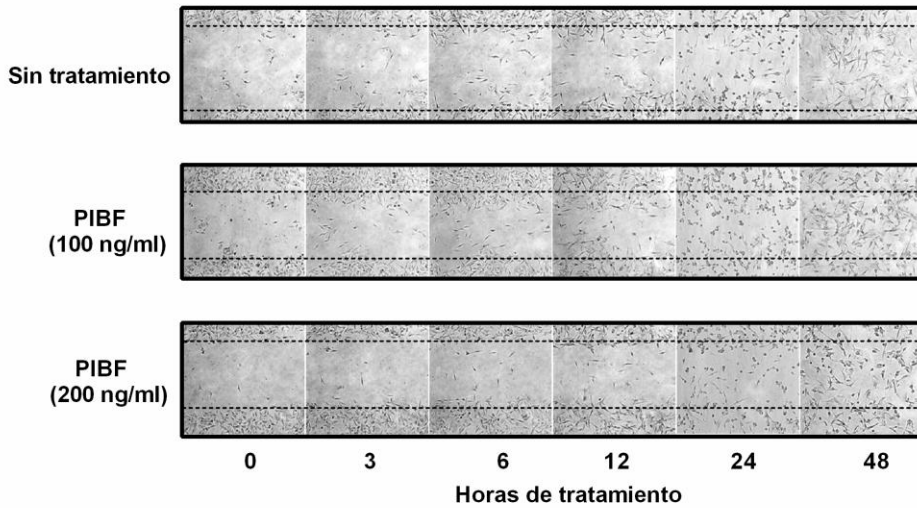


**Figura 13. Efecto del PIBF en la proliferación de las células U87.** La evaluación de la proliferación celular en la línea U87 fue obtenida mediante el ensayo de incorporación de BrdU. Las células fueron tratadas con PIBF recombinante (100 ng/ml) y los tratamientos se mantuvieron durante 4 días. Se pueden observar las fotografías representativas de las inmunofluorescencias del núcleo (Hoechst, panel superior), células positivas a BrdU (panel medio) y el empalme (panel inferior). Recuadro: ampliación 40 X de la incorporación de BrdU. Se muestra la gráfica derivada de tres experimentos independientes, después de obtener el porcentaje de células que incorporaron BrdU. Los resultados son expresados como media  $\pm$  S.D. (\*)  $p < 0.05$  comparados con las células sin tratamiento.

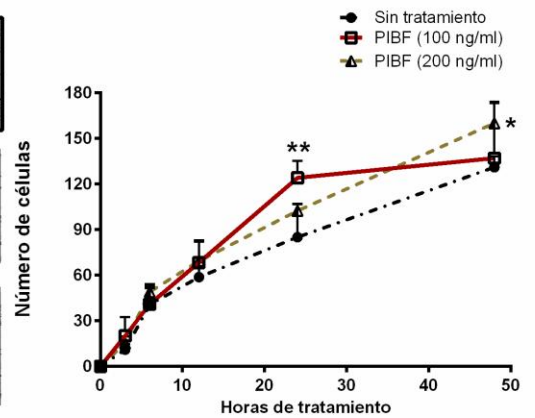
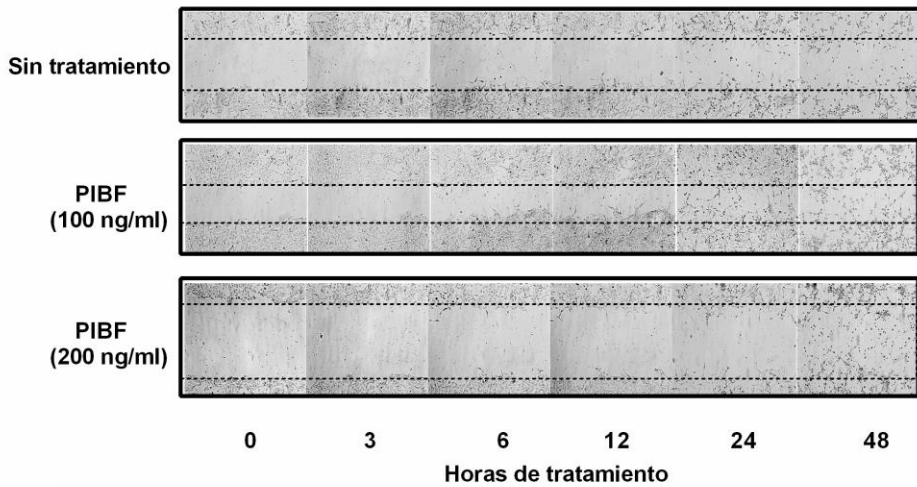
### *8.5. Participación del PIBF en la migración en las líneas celulares U87 y U251 derivadas de glioblastomas humanos*

Para evaluar si el PIBF modificaba la migración de células en las líneas U87 y U251 se realizó un ensayo de herida, en el que se utilizó el inhibidor de la síntesis de DNA, Ara-C, para descartar efectos en la migración debido a un aumento en proliferación celular mediado por el PIBF. La concentración utilizada se decidió tomando en cuenta un trabajo previo en donde se demostraba que esta proteína a 100 ng/ml inducía la migración de células HT-1080, derivadas de fibrosarcoma humano (Halasz et al., 2013), de igual manera, la concentración de 200 ng/ml se utilizó debido a que en el presente trabajo, así como en un estudio previo realizado en nuestro laboratorio, se demostró que a esta concentración del rPIBF aumenta el número de células derivadas de glioblastomas humanos (González-Arenas et al., 2014). Los tratamientos se mantuvieron por 48 horas, reemplazando el medio cada 24 horas y tomando las fotografías correspondientes a las 0, 3, 6, 12, 24 y 48 horas posteriores al tratamiento. Como se puede observar en la **figura 14**, la concentración de 100 ng/ml del rPIBF aumenta la migración de las células con respecto a aquellas sin tratamiento, a partir de las 12 y 24 horas en las células U87 y U251 respectivamente. Mientras que no se observó diferencia significativa con el tratamiento de 200 ng/ml con respecto al vehículo en la línea U87, pero sí a las 48 horas en la línea U251.

### Células U87



### Células U251

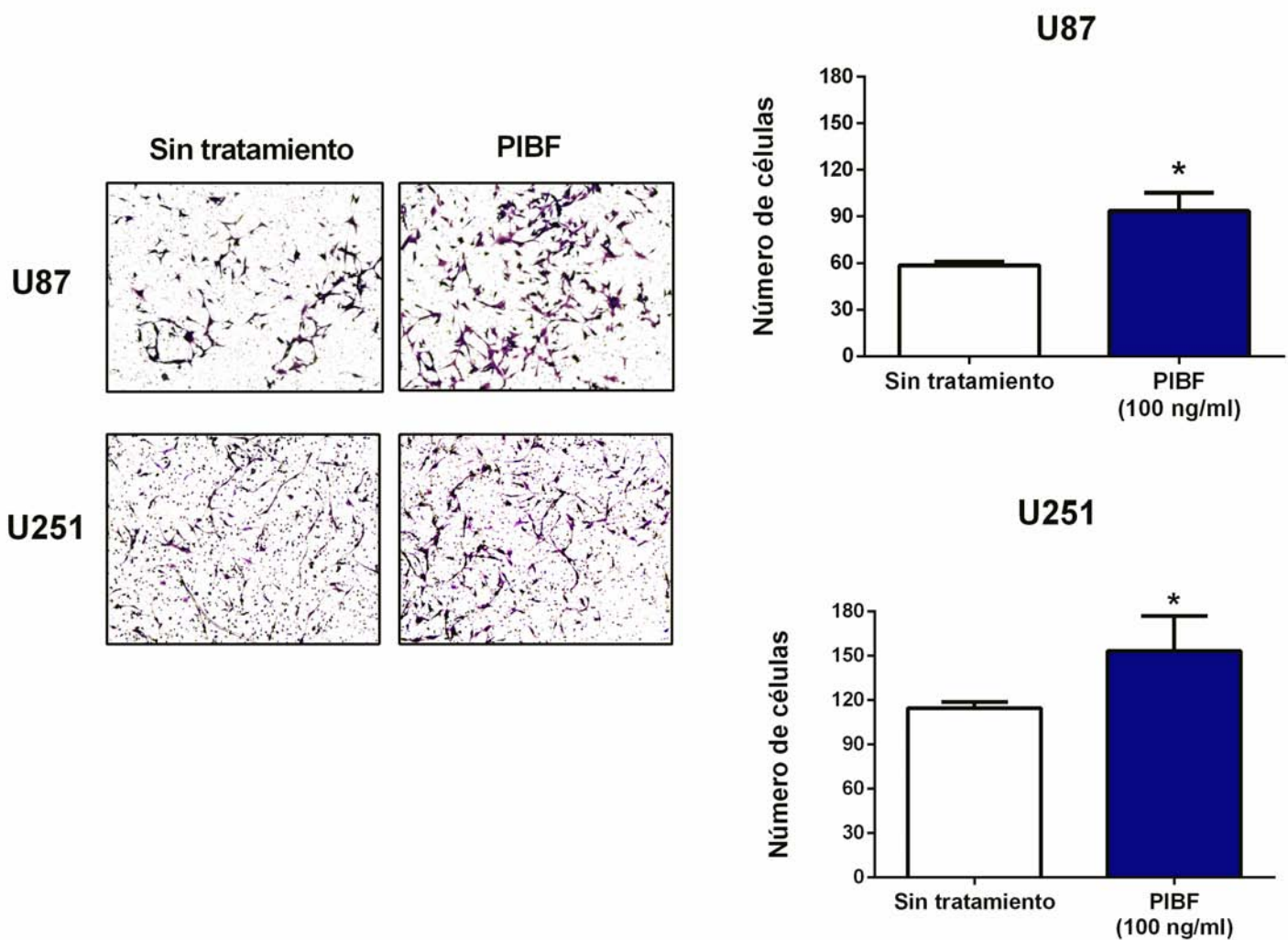


**Figura 14. Efecto del PIBF en la migración de las células U87 y U251.** La evaluación de la migración de las células fue obtenida mediante el ensayo de herida. Las células fueron tratadas con PIBF recombinante (100 y 200 ng/ml) y se utilizó medio como vehículo, los tratamientos se mantuvieron durante 48 horas. En el panel de la izquierda se pueden observar las fotografías representativas a los distintos tiempos del ensayo. En el panel de la derecha se muestran las gráficas obtenidas de cuatro experimentos independientes, después del conteo de células en el área de la herida. Los resultados son expresados como media  $\pm$  S.D. (\*)  $p < 0.01$  y (\*\*)  $p < 0.001$  comparado con las células sin tratamiento.

### *8.6. Efecto del PIBF en la invasión en las líneas celulares U87 y U251*

La agresividad del GBM se relaciona con el grado de invasión que presenta el tumor en el SNC, por lo que es importante dilucidar los factores involucrados en aumentar este proceso de invasión celular. Se evaluó el efecto del PIBF en la capacidad de invasión de las células U87 y U251 mediante un ensayo “transwell”, en el cual se utiliza una membrana de policarbonato en la parte inferior de un inserto, con un tamaño de poro de 8  $\mu\text{m}$  que permite retener las células que crucen el gel de ECM, que se compone de una mezcla de proteínas secretadas por las células de sarcoma de ratón Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) que asemejan la matriz extracelular, complejo proteico que es degradado por las células para llevar a cabo un proceso de invasión. Debido a que, junto con la proteólisis de proteínas de la matriz extracelular, la migración también es un fenómeno necesario para que se lleve a cabo la invasión celular, se utilizó la concentración de 100 ng/ml que causó un aumento en la migración en la línea celular U87 y U251 y se mantuvo el tratamiento por 24 horas. El PIBF aumentó de manera significativa la invasión de las células U87 y U251 con respecto al vehículo tal como se observa en la **figura 15**.





**Figura 15. Efecto del PIBF en la invasión de células U87 y U251.** La evaluación de la invasión celular en las células de glioblastomas humanos fue obtenida mediante el ensayo “transwell”. Las células fueron tratadas con PIBF recombinante (100 ng/ml) y se utilizó el medio como vehículo, los tratamientos se mantuvieron durante 24 horas. En el panel de la izquierda se pueden observar las fotografías representativas de la invasión celular. En el panel de la derecha se muestran las gráficas obtenidas de cuatro experimentos independientes, después del conteo de células que invadieron el gel de ECM. Los resultados son expresados como media  $\pm$  S.D. (\*)  $p < 0.01$  comparado con las células sin tratamiento.

### *8.7. Participación del IL-4R $\alpha$ en los procesos invasivos mediados por el PIBF en células U87 derivadas de un astrocitoma humano grado IV.*

En evidencia mostrada en trabajos previos realizados por nuestro grupo de trabajo, se determinó la importancia de la activación de la vía IL-4R/JAK1/STAT6 por el PIBF en el aumento en número de células derivadas de un astrocitoma humano. Sin embargo, se desconocía si también esta activación podía conllevar a un aumento en los procesos invasivos mediados por este factor. Con el objetivo de evaluar la participación del IL-4R $\alpha$  en los procesos invasivos mediados por el PIBF en las células derivadas de glioblastomas humanos, se realizó un ensayo de silenciamiento génico con siRNAs. Se utilizó Lipofectamina<sup>TM</sup> RNAiMAX, como agente de transfección, un siRNA control dirigido a una secuencia no específica, así como un siRNA específico contra el IL-4R $\alpha$ , el silenciamiento se comprobó mediante el ensayo de WB para el IL-4R $\alpha$ , en el que se logró un silenciamiento del 55% del receptor. Se procedió a realizar los ensayos de herida con células silenciadas para el IL-4R $\alpha$  y se adicionó el tratamiento del PIBF a la concentración mínima observada (100 ng/ml) que ocasionó un aumento en la migración de células en la línea U87, en la que se observó el aumento de la migración celular en forma constante y en un tiempo más corto. Como se observa en la **figura 17**, la lipofectamina, el siRNA control y el siRNA específico para el IL-4R $\alpha$ , no tuvieron ningún efecto en la migración de células, sin embargo, de forma interesante, la disminución de expresión del IL-4R $\alpha$  no bloqueó el efecto de aumento de migración celular mediado del PIBF. Lo que indica que el IL-4R $\alpha$  no tiene un papel importante en este proceso. Debido a que la migración celular es un fenómeno necesario para llevar que la invasión celular, al no haber efecto en este primer proceso, no se procedió a realizar el ensayo de invasión.

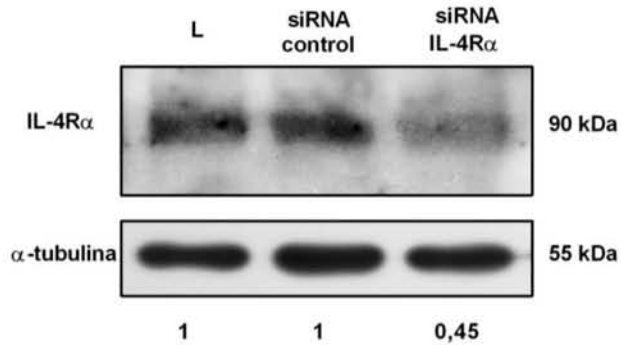
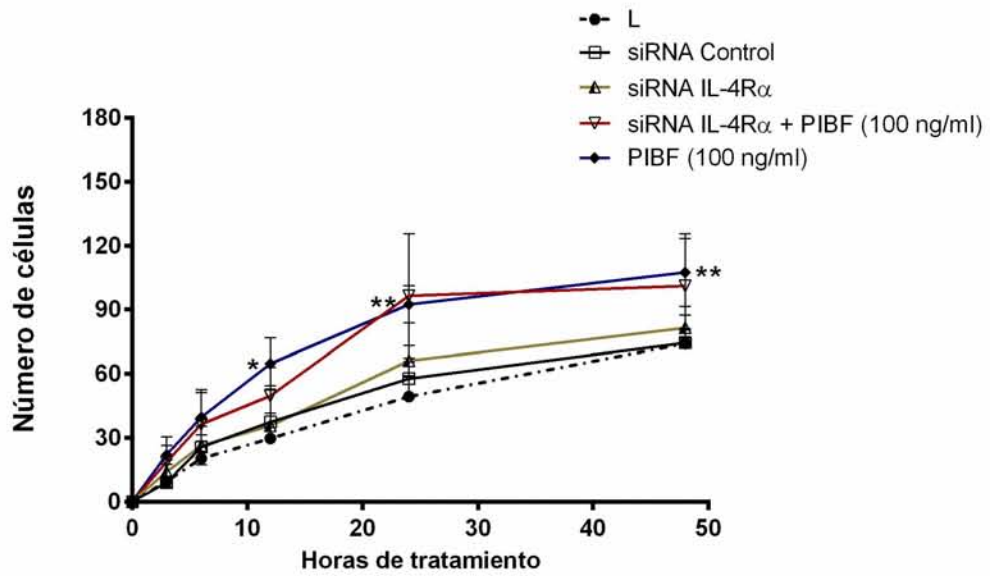
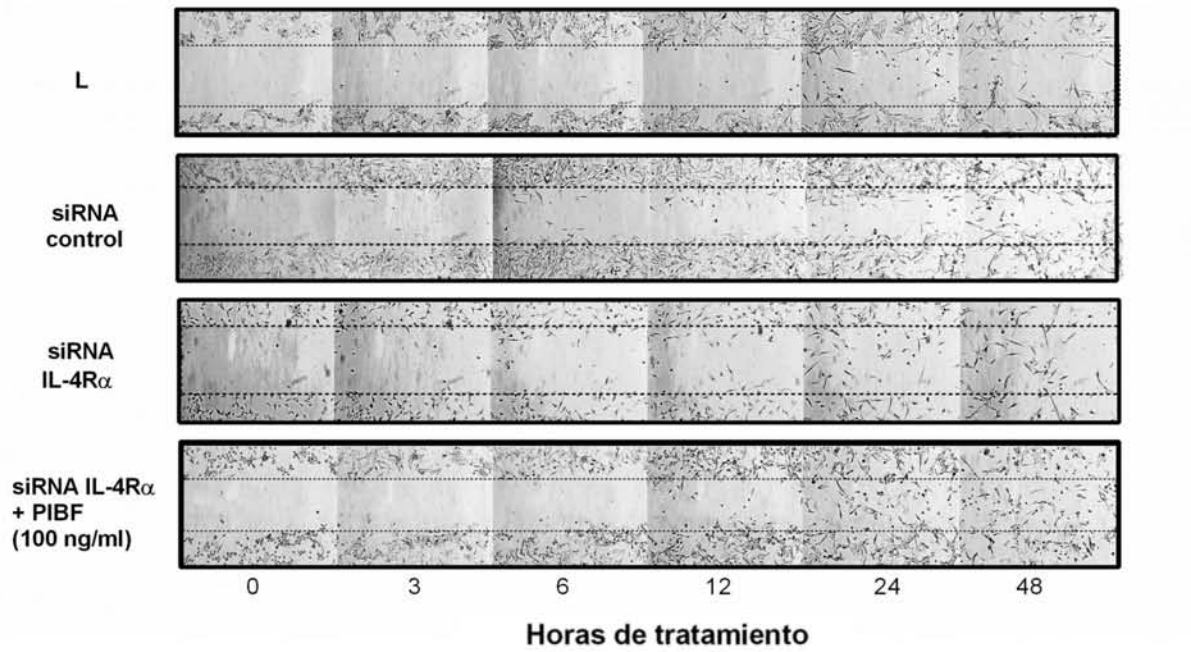


Figura 17. Participación del IL-4R $\alpha$  en el aumento de la migración mediado por el PIBF de las células U87. Las células fueron tratadas durante 6 horas con el

agente de transfección Lipofectamina RNAiMAX (L), siRNA control, que no contiene ninguna secuencia blanco específica, siRNA IL-4R $\alpha$  (50 nM), a continuación, se reemplazó el medio y las células se dejaron incubar por 48 horas. Posteriormente la evaluación de la migración de las células fue obtenida mediante el ensayo de wound-healing. Las células silenciadas para IL-4R $\alpha$  fueron tratadas con PIBF recombinante (100 ng/ml). En el panel superior se pueden observar las fotografías representativas a los distintos tiempos del ensayo. En el panel medio se muestran las gráficas obtenidas de tres experimentos independientes, después del conteo de células en el área de la herida. Los resultados son expresados como media  $\pm$  S.D. (\*)  $p < 0.01$  y (\*\*)  $p < 0.001$  comparado con el vehículo. El panel inferior se muestra un blot representativo de la reducción de la expresión del IL-4R $\alpha$  y su respectivo control de carga. Los datos resultantes fueron corregidos con los valores de la  $\alpha$ -tubulina.

## 9. Discusión

El glioblastoma es el tumor cerebral más común y agresivo en humanos, tiene una alta tasa de mortalidad debido a su crecimiento descontrolado, su gran capacidad para infiltrarse en el tejido adyacente y su recurrencia a corto plazo (Furnari et al., 2007). Los tratamientos actuales no mejoran la calidad de vida ni extienden el tiempo de supervivencia del paciente ya que resultan altamente tóxicos y presentan diversos efectos secundarios severos (Riemenschneider et al., 2009; Cheng et al., 2010). Es de gran importancia la búsqueda de posibles blancos terapéuticos para así diseñar tratamientos coadyuvantes a los tratamientos estándar. Resultados obtenidos en nuestro laboratorio han demostrado que la P<sub>4</sub> induce *in vitro* en las líneas celulares U251, U87 y D54, e *in vivo* en un modelo murino, la proliferación e invasión de células de glioblastoma, principalmente por la activación del RP, debido a que el RU486 bloquea parcialmente dichos efectos (Gonzalez-Agüero et al., 2007; Germán-Castelán et al., 2014; Piña Medina et al., 2016), sin embargo, los mecanismos implicados en estos efectos no han sido totalmente entendidos.

Hay reportes que muestran un incremento de los niveles séricos del PIBF posterior al tratamiento con  $P_4$ , tanto en mujeres sanas como en aquellas con diversas patologías ginecológicas, con lo anterior se demostró que no es necesario un estímulo adicional como la presencia de un feto para aumentar los niveles de PIBF en el suero, como se sugería inicialmente cuando se descubrió este factor en los linfocitos de mujeres embarazadas. De forma interesante, en este mismo estudio se demostró que las progestinas sintéticas, nandrolona (derivada de la 19-nortestosterona) y la 17-hidroxiprogestero (OHP) no causaron una modificación en los niveles séricos del PIBF (Cohen et al., 2016). Además, hay evidencia que indica que en las células MCF-7 derivadas de un adenocarcinoma de mama, la  $P_4$  no es capaz de aumentar la expresión del PIBF al nivel del mRNA (Lachmann et al., 2004).

Con el objetivo de conocer si en las células derivadas de un glioblastoma humano, la  $P_4$  ejercía un efecto inductor de la expresión del PIBF, se realizó un ensayo de RT-PCR, en este estudio se demostró que la  $P_4$  incrementó de manera significativa la expresión génica del PIBF a las 12 horas y este efecto permaneció hasta las 24 horas, se realizaron pruebas desde 1 hora de tratamiento (datos no mostrados) pero no se observó ninguna diferencia entre el vehículo y la  $P_4$ , por otra parte, tomando en consideración que el estudio se realizó hasta las 24 horas posteriores al tratamiento con la  $P_4$ , no se pudo observar por cuanto tiempo la expresión del PIBF continuaba manteniendo esta inducción por la hormona. De manera interesante, reportes previos de nuestro laboratorio demostraron que la  $P_4$  incrementó la expresión del PIBF desde 1 hora hasta 24 horas posterior al tratamiento en la línea celular U373 derivada de un astrocitoma humano de grado III (ahora conocida como línea U251, derivada de un glioblastoma humano) (González-Arenas et al., 2014), sugiriéndose una regulación hormonal diferencial del PIBF en ambas líneas celulares. Los efectos de inducción temprano y tardío en la expresión del PIBF a nivel del mRNA dependiendo de la línea celular, pudieron haber sido resultado de las diferencias en la expresión de los RP en ambas líneas, debido a que en las células U251 la tasa RP-B/RP-A es de 3:1, mientras que en la línea U87 esta relación es de 2:1 (Hansberg-Pastor et al., 2016), esto podría significar una mayor actividad transcripcional posterior a la unión de la  $P_4$ , además, esta diferencia de relación de los RP se pudiese explicar a su vez, por el patrón de

mutaciones con los que se han caracterizado cada línea celular derivada de glioblastomas. Las células U251 presentan mutaciones en los genes TP53, EGFR y PTEN, mientras que las células U87 no cuentan con dichas alteraciones (Patil et al., 2015). Sin embargo, se debe considerar que, aunque el glioblastoma humano exhibe alta heterogeneidad celular, la inducción de la expresión del PIBF se obtuvo en las dos líneas celulares estudiadas.

El PIBF exhibe varias isoformas producidas por el proceso de “splicing” alternativos (Lachmann et al., 2014; Bodgan et al., 2014), pero en células tumorales estas isoformas no han sido completamente caracterizadas. En las células U87 se observaron dos isoformas, la proteína de 90 kDa codificada por el mRNA de tamaño completo y una isoforma más pequeña de 57 kDa, ambas encontradas de igual manera por González-Arenas et al., (2014) en las células U251. Hay varios reportes que indican que la isoforma de 90 kDa se encuentra localizada principalmente en el núcleo y está asociada con el centrosoma, mientras que las demás isoformas más pequeñas se han encontrado en los compartimentos intra- y extra celulares, y se sugiere que funcionan de forma autocrina activando diversas vías de señalización (González-Arenas et al., 2014; Lachmann et al., 2004). En las células U87 no se observaron cambios en el contenido de la proteína del PIBF de tamaño completo después del tratamiento con  $P_4$ , pero éste sí incrementó el contenido de la proteína de 90 kDa en las células U251 (González-Arenas et al., 2014), lo que se podría deber a la diferencia en la tasa RP-B/RP-A que se mencionó anteriormente. Un hallazgo interesante, es la presencia de dos bandas correspondientes a proteínas con un peso molecular aproximado al esperado de la isoforma de 90 kDa, con una diferencia de 8 kDa entre ellas. El PIBF contiene varios sitios de posibles modificaciones postraduccionales, siendo una de ellas la N-glicosilación, la unión de carbohidratos a la proteína puede ocasionar un incremento en el peso molecular (Guan et al., 2015), esta modificación podría explicar la diferencia de pesos entre las dos bandas observadas en el blot. Algo remarcable es que el contenido de la proteína de 57 kDa fue regulada positivamente a las 24 horas por  $P_4$  en las células U87, pero no en las células U251, esto contrasta con la información hasta ahora discutida, tomando en consideración que las células U251 tienen una mayor respuesta a la acción de la  $P_4$ . En este caso, la inducción hormonal en las células U87 podría

deberse al patrón diferencial de mutaciones en las dos líneas celulares. En ambas líneas, el efecto inductor de la hormona fue bloqueado por el antagonista del RP, el RU486, sugiriendo su regulación a través del RP. Más experimentos con líneas celulares y biopsias son necesarios para evaluar los procesos involucrados en esta regulación diferencial de la expresión del PIBF dependiendo de la tasa RP-B/RP-A y de las mutaciones específicas en las células de glioblastoma humano.

La expresión del PIBF se ha descrito en diversas células con alta tasa de proliferación (Kyurkchiev et al., 2011). Se ha sugerido que las isoformas del PIBF actúan como ligandos implicados en la activación de vías de señalización relacionadas con proliferación, incluyendo JAK1/STAT6 (Lachmann et al., 2004; González-Arenas et al., 2014; Halasz et al., 2013, Kozma et al., 2006), a través de la interacción con un heterocomplejo que consiste en el PIBF-R, el cual está anclado a la membrana plasmática por un grupo de GPI (De la Haba et al., 2014) y un receptor de membrana IL-4R  $\alpha$  (Kozma et al., 2006; González-Arenas et al., 2014). En estudios previos, se mostró que el rPIBF (200 ng/ml) incrementó el número de células U251 derivadas de un astrocitoma humano grado IV. En este mismo estudio, se demostró que el PIBF aumenta la fosforilación de JAK1 y STAT6, asimismo, se observó, que el PIBF interactúa con IL-4R $\alpha$ , por lo que se sugirió que el aumento en el número de células era a través de la activación de la vía IL-4R $\alpha$ /JAK1/STAT6 (González-Arenas et al., 2014). Sin embargo, aunque la presencia de esta proteína se había estudiado por diversos grupos de trabajo en distintos tipos de células altamente proliferativas y además se había observado su efecto en el aumento de número de células derivadas de astrocitoma; en este trabajo, se estudió por primera vez, el efecto directo del PIBF en la proliferación celular, la cual se vio aumentada en las células U87 derivadas de un glioblastoma humano, por consiguiente se sugiere que el aumento del número de células U87 es causado principalmente por un proceso proliferativo y que, de acuerdo a estudios previos realizados en nuestro laboratorio y por otros grupos de trabajo, podría deberse a la activación de la vía IL-4R $\alpha$ /JAK1/STAT6.

Por otro lado, la activación de vías de señalización como la vía JAK2/STAT3, que se encuentra sobreactivada en glioblastomas, promueve la migración e invasión de diversos tipos de cáncer (Senft et al., 2011; Priester et al., 2014). De forma interesante,

en la línea celular HT-1080 derivada de un fibrosarcoma humano, se ha reportado que el PIBF está implicado en el aumento de la fosforilación de STAT3 (Halasz et al., 2013). En este estudio, observamos que el rPIBF (100 ng/ml) promueve la migración de células de glioblastoma a las 12 y 24 horas en las líneas U87 y U251 respectivamente, lo que concuerda con los resultados obtenidos en las células derivadas de un fibrosarcoma humano obtenidos por Halasz et al., en el 2013. Tomando en consideración que la  $P_4$  tiene efectos en la remodelación del citoesqueleto de actina (Piña-Medina et al., 2016; Hansberg-Pastor et al., 2015), el PIBF pudiese estar regulando parcialmente esta remodelación ocasionando el aumento en la migración de las células. De forma remarcable, ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina en las células HT-1080 demostraron que el PIBF se une a las regiones promotoras de la interleucina-6 (IL-6) (Halasz et al., 2013), una citocina sobreexpresada en glioblastomas que actúa como ligando de la vía JAK2/STAT3 (Authier et al., 2015; Senft et al., 2011). Por lo tanto, la sobreactivación de esta vía por el PIBF pudiera ser otro posible mecanismo que explique sus efectos en la migración celular.

El PIBF también se une a la región promotora del gen del factor del crecimiento epidérmico (EGF) en las células de fibrosarcoma humano (Halasz et al., 2013). El EGF a través de su receptor (EGFR) el cual se encuentra frecuentemente sobreexpresado en glioblastomas (Thorne et al., 2016), promueve la transcripción de genes asociados con la proteólisis de los componentes de la matriz extracelular tales como las metaloproteinasas 2 y 9 (MMP-2 y 9) (Halasz et al., 2013). En este trabajo, se mostró que el tratamiento con el rPIBF (100 ng/ml) aumentó la capacidad de invasión de ambas líneas a las 24 horas. Se sugiere que el aumento de la capacidad invasiva fue resultado de la secreción de MMPs, que son productos indirectos de la transcripción de genes relacionados con el EGF. Tomando en consideración que el PIBF actúa como factor de transcripción (Halasz et al., 2013), se sugiere que la participación del PIBF en la regulación de diversos genes blanco, tales como IL-6 y EGF, pudiera ocasionar los efectos de migración e invasión de las células de glioblastoma. Sin embargo, el efecto en ambos procesos fue resultado de la proteína recombinante que contenía diversas isoformas, por lo que aún se desconoce cuál de éstas promueve la proliferación e invasión en estas células.



La activación del IL-4R $\alpha$  en células inflamatorias promueve la inflamación mediada por Th2, la cual se ha asociado con la progresión tumoral al inhibir la respuesta inmune celular mediada por citocinas Th1 (Ellyard et al., 2007). EL PIBF ocasiona una disminución en la tasa Th1/Th2 en linfocitos maternos y promueve la fosforilación del IL-4R $\alpha$  posterior a la unión de este factor a su receptor heterocomplejo PIBF-R/IL-4R $\alpha$ , lo que inicia la activación de la vía IL-4R $\alpha$ /JAK1/STAT6, que conlleva a un aumento en la proliferación celular que tiene como consecuencia un aumento en el número de células (González-Arenas et al., 2014). Sin embargo, hasta el momento, se desconocía si el IL-4R $\alpha$  participaba además en el aumento de procesos invasivos; en este trabajo se demostró, por medio del uso de siRNAs dirigidos específicamente para el gen que codifica para este receptor y con el uso del ensayo de herida, que la disminución de la expresión del IL-4R $\alpha$  no bloquea el aumento de la migración mediada por el PIBF en células derivadas de un glioblastoma humano, lo que indica que este factor no necesita de la activación de la vía IL-4R $\alpha$ /JAK1/STAT6 para efectuar su potencial invasivo. Se ha descrito un mecanismo de endocitosis independiente de clatrina que se caracteriza por la capacidad de internalizar proteínas ancladas a grupos de GPI, así como a toxinas de bacterias (Doherty & Lundmark, 2009). Se sugiere entonces que el PIBF pudiese internalizarse por medio de la unión al PIBF-R, por lo que no necesitaría la presencia del IL-4R $\alpha$ , esta internalización podría promover la traslocación del PIBF al núcleo para funcionar como factor de transcripción de genes blanco relacionados con la invasión celular.

## **10. Conclusiones**

En este trabajo se estudio la regulación del PIBF por P<sub>4</sub>, así como sus efectos en los procesos de proliferación, migración e invasión celulares. En conclusión, de acuerdo a los resultados obtenidos se sugiere que:

- La P<sub>4</sub> regula positivamente la expresión del PIBF a nivel del mRNA y de la proteína, por la activación del RP en células derivadas de un astrocitoma humano de grado IV y esta regulación podría depender de la relación RP-B/RP-A y del perfil de mutaciones de las células tumorales.

- El PIBF induce proliferación celular aumentando significativamente el número de células U87 derivadas de un glioblastoma humano.
- El PIBF aumenta también la migración e invasión celulares de las líneas U87 y U251 derivadas de glioblastomas humanos y estos procesos invasivos, al contrario de los proliferativos, no requieren de la activación del heterocomplejo PIBF-R/IL-4R $\alpha$ .

Estos resultados sugieren que el PIBF participa en la regulación de los mecanismos involucrados con la progresión tumoral de los glioblastomas en un modelo *in vitro*.

## 11. Perspectivas

En el presente estudio se evaluó la regulación del PIBF por P<sub>4</sub>, para conocer si la hormona tiene efecto inductivo también en la isoforma de 90 kDa, se necesitarían estudios en periodos más largos. En este trabajo se estudiaron, además, los efectos del PIBF en la progresión tumoral *in vitro* de células derivadas de glioblastomas humanos, lo que involucra procesos proliferativos e invasivos desregulados; esto abre nuevas perspectivas en el estudio de estos fenómenos en un modelo *in vivo*, tomando en consideración que el microambiente tumoral es un factor importante para el estudio de todo tipo de cáncer. Estudios de la maquinaria de “splicing” o bien con sobreexpresión específica de cada isoforma del PIBF son necesarios para conocer la participación de cada isoforma en todos los procesos estudiados en este trabajo y con esto, dilucidar sus efectos diferenciales. Asimismo, faltaría conocer las vías de señalización que están siendo activadas por el PIBF y que ocasionan el aumento de la capacidad invasiva de células de glioblastoma. Finalmente, siendo descartada la participación del IL-4R $\alpha$  en este fenómeno invasivo mediado por el PIBF, es necesario evaluar mediante estudios de localización celular por inmunofluorescencia, si existe una internalización de este factor sin llevar a cabo una activación del receptor formado por el heterocomplejo PIBF-R/IL-4R $\alpha$ .

## 12. Referencias

- Abou-Ghazal M, Yang DS, Qiao W, Reina-Ortiz C, Wei J, Kong LY, Fuller GN, Hiraoka N, Priebe W, Sawaya R, Heimberger AB (2008). The incidence, correlation with tumor-infiltrating inflammation, and prognosis of phosphorylated STAT3 expression in human gliomas, *Clinical Cancer Research*, 14: 8228–8235.
- Adamson C, Kanu O, Mehta AI, Di C, Lin N, Mattox AK, Bigner DD (2009). Glioblastoma multiforme: a review of where we have been and where we are going. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 18: 1061–1083.
- Alcantara Llaguno S, Chen J, Kwon CH, Jackson EL, Li Y, Burns DK, Parada LF (2009). Malignant Astrocytomas originate from neural stem/progenitor cells in a somatic tumor suppressor mouse model. *Cancer Cell*, 15: 45–56.
- Alcantara Llaguno S, Chen J, Parada L (2009). Signaling in malignant astrocytomas: role of neural stem cells and its therapeutic implications. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 15: 7124–7129.
- Anderle C, Hammer A, Polgar B, Hartmann M, Wintersteiger R, Blaschitz A, Sedlmayr P (2008). Human trophoblast cells express the immunomodulator progesterone-induced blocking factor. *Journal of Reproductive Immunology*, 79: 26–36.
- Anderson E (2012). The role of endocytosis in activating and regulating signal transduction. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 69: 1755-1771.
- Arko L, Katsyv I, Park GE, Luan WP, Park JK (2010). Experimental approaches for the treatment of malignant gliomas. *Pharmacology & Therapeutics*, 128: 1–36.
- Authier A, Farrand KJ, Broadley KWR, Ancelet LR, Hunn MK, Stone S, Hermans IF (2015). Enhanced immunosuppression by therapy-exposed glioblastoma multiforme tumor cells. *International Journal of Cancer*, 136: 2566–2578.
- Balassa T, Polgar B (2015). Effects of silencing Progesterone-Induced Blocking Factor (PIBF) in choriocarcinoma cells and primary tumour cells. *Journal of Reproductive Immunology*, 111: 25.
- Baulieu EE, Schumacher M, Koenig H, Jung-Testas I, Akwa Y (1996). Progesterone as a neurosteroid: Actions within the nervous system. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 16: 143–154.

Bogdan A, Polgar B, Szekeres-Bartho J (2014). Progesterone induced blocking factor isoforms in normal and failed murine pregnancies. *American Journal of Reproductive Immunology*, 71: 131–136.

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.

Brandes A, Tosoni A, Franceschi E, Reni M, Gatta G, Vecht C (2008). Glioblastoma in adults. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 67: 139–152.

Brinton RD, Thompson RF, Foy MR, Baudry M, Wang J, Finch CE, Nilsen J (2009). Progesterone receptors: form and function in brain. *Frontier in Neuroendocrinology*, 29: 313–339.

Brunton PJ, Russell J (2008). The expectant brain: adapting for motherhood. *Nature Reviews. Neuroscience*, 9(january): 11–25.

Caballero OL, de Souza SJ, Brentani RR, Simpson J (2001). Alternative spliced transcripts as cancer markers. *Disease Markers*, 17: 67–75.

Cabrera-Muñoz E, González-Arenas A, Saqui-Salces M, Camacho J, Larrea F, García-Becerra R., Camacho-Arroyo I (2009). Regulation of progesterone receptor isoforms content in human astrocytoma cell lines. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 113: 80–84.

Camacho-Arroyo I., Hansberg-Pastor V., Vázquez-Martínez ER, Cerbón M. Mechanism of Progesterone Action in the Brain (2017). In: Pfaff DW, Joëls M, editors. *Hormones, Brain, and Behavior 3rd edition, Vol 3*. Oxford: Academic Press: 181–214.

Camacho-Arroyo I, Rodríguez-Dorantes M (2006). Transcriptional activity regulated by progesterone receptor isoforms. *Molecular Endocrinology Research Signpost*, 37/661: 25-38.

Camacho-Arroyo I, Villamar-Cruz O, González-Arenas A, Guerra-Araiza C (2002). Participation of the 26S proteasome in the regulation of progesterone receptor concentrations in the rat brain, *Neuroendocrinology*, 76: 267– 271.

Check JH, Dix E, Sansoucie L (2009). Support for the hypothesis that successful immunotherapy of various cancers can be achieved by inhibiting a progesterone associated immunomodulatory protein. *Medical Hypotheses*, 72: 87–90.

Check JH, Nazari P, Goldberg J, Yuen W, Angotti D (2001). A model for potential tumor immunotherapy based on knowledge of immune mechanisms responsible for spontaneous abortion. *Medical Hypotheses*, 57: 337–343.

Chen J (2014). The unique pharmacological characteristics of mifepristone (RU486): from terminating pregnancy to preventing cancer metastasis. *Medicinal Research Reviews*. 34: 979-1000.

Cheng L, Bao S, Rich JN (2010). Potential therapeutic implications of cancer stem cells in glioblastoma. *Biochemical Pharmacology*, 80: 654–665.

Conneely OM, Lydon JP (2000). Progesterone receptors in reproduction: Functional impact of the A and B isoforms. *Steroids*, 65: 571–577.

Daumas-Duport C, Scheithauer B, O'Fallon J, Kelly P (1969). Grading of Astrocytomas. *Cancer*, 62: 2152–2165.

De La Haba C, Palacio JR, Palkovics T, Szekeres-Bartho J, Morros A, Martínez P (2014). Oxidative stress effect on progesterone-induced blocking factor (PIBF) binding to PIBF-receptor in lymphocytes. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1838(1): 148–157.

Doherty G, Lundmark R (2009). GRAF1-dependent endocytosis. *Biochemical society transactions*, 37: 1061-1065.

Ellyard J, Simson L, Parish C (2007). Th2-mediated anti-tumour immunity: friend or foe? *Tissue antigens*, 70: 1-11.

Faust Z, Laskarin G, Rukavina D, Szekeres-Bartho J (1999). Progesterone-induced blocking factor inhibits degranulation of natural killer cells. *American Journal of Reproductive Immunology*, 42: 71–75.

Furnari FB, Fenton T, Bachoo RM, Mukasa A, Stommel JM, Stegh A, Cavenee WK (2007). Malignant astrocytic glioma: Genetics, biology, and paths to treatment. *Genes and Development*, 21: 2683–2710.

Germán-Castelán L, Manjarrez-Marmolejo J, González-Arenas A, González-morán MG, Camacho-Arroyo I (2014). Progesterone Induces the Growth and Infiltration of Human Astrocytoma Cells Implanted in the Cerebral Cortex of the Rat. *BioMedical Research International*, 2014: 1–8.

Giangrande PH, McDonnell DP (1999). The A and B isoforms of the human progesterone receptor: two functionally different transcription factors encoded by a single gene. *Recent Progress in Hormone Research*. 54: 291–313.

González-Agüero G, Gutiérrez A, González-Espinosa D, Solano JD, Morales R, González-Arenas A, Camacho-Arroyo I (2007). Progesterone effects on cell growth of U373 and D54 human astrocytoma cell lines. *Endocrine*, 32: 129–135.

González-Agüero G, Ondarza R, Gamboa-Domínguez A, Cerbón M, Camacho-Arroyo I (2001). Progesterone receptor isoforms expression pattern in human astrocytomas. *Brain Research Bulletin*, 56: 43–48.

González-Arenas A, Peña-Ortiz MÁ, Hansberg-Pastor V, Marquina-Sánchez B, Baranda-Ávila N, Nava-Castro K, Camacho-Arroyo I (2015). PKC $\alpha$  and PKC $\delta$  activation regulates transcriptional activity and degradation of progesterone receptor in human astrocytoma cells. *Endocrinology*, 156(May): 1010–1022.

González-Arenas A, Valadez-Cosmes P, Jiménez-Arellano C, López-Sánchez M, Camacho-Arroyo I (2014). Progesterone-induced blocking factor is hormonally regulated in human astrocytoma cells and increases their growth through the IL-4R / JAK1 / STAT6 pathway. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 144: 463–470.

González-Flores O, Gómora-Arrati P, García-Juárez M, Miranda-Martínez A, Armengual-Villegas A, Camacho-Arroyo I, Guerra-Araiza C (2011). Progesterone receptor isoforms differentially regulate the expression of tryptophan and tyrosine hydroxylase and glutamic acid decarboxylase in the rat hypothalamus. *Neurochemistry International*, 59: 671–676.

Guan Y, Zhu Q, Huang D, Lo L, Peng J (2015). An equation to estimate the difference between theoretically predicted and SDS PAGE-displayed molecular weights for an acidic peptide. *Scientific Reports*, 5: 13370.

Gutiérrez-Rodríguez A, Camacho-Arroyo I (2016). Papel del factor de bloqueo inducido por progesterona (PIBF) en embarazo y cáncer. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 19: 109–115.

Halasz M, Polgar B, Berta G, Czimbalek L, Szekeres-Bartho J (2013). Progesterone-induced blocking factor differentially regulates trophoblast and tumor invasion by altering matrix metalloproteinase activity. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 70: 4617–4630.

Hanahan D, Weinberg R (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144: 646-674.

Hansberg-Pastor V, González-Arenas A, Camacho-Arroyo I (2017). CCAAT/enhancer binding protein  $\beta$  negatively regulates progesterone receptor expression in human glioblastoma cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 439: 317-327.

Hansberg-Pastor V, González-Arenas A, Piña-Medina A, Camacho-Arroyo I (2015). Sex hormones regulate cytoskeletal proteins involved in brain plasticity. *Frontiers in psychiatry*, 6: 165.

Hwang JH, Smith CA, Salhia B, Rutka JT (2008). The role of fascin in the migration and invasiveness of malignant glioma cells. *Neoplasia*, 10: 149–159.

Hernández-Hernández OT, González-García 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. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 132: 127–134.

Ichimura K, Ohgaki H, Kleihues P, Collins VP (2004). Molecular pathogenesis of astrocytic tumours. *Journal of Neuro-Oncology*, 70: 137–160

Inoue T, Akahira JI, Suzuki T, Darnel AD, Kaneko C, Takahashi K, Sasano H (2002). Progesterone production and actions in the human central nervous system and neurogenic tumors. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 87(May): 5325–5331.

Jhanwar-Uniyal M, Labagnara M, Friedman M, Kwasnicki A, Murali R (2015). Glioblastoma: Molecular Pathways, Stem Cells and Therapeutic Targets. *Cancers*, 7: 538–555.

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.

Kelemen K, Bogнар I, Paal M, Szekeres-Bartho JA (1996). Progesterone-induced protein increases the synthesis of asymmetric antibodies. *Cellular Immunology*, 167: 129-134.

Kim K, Rhee K (2011). The pericentriolar satellite protein CEP90 is crucial for integrity of the mitotic spindle pole. *Journal of Cell Science*, 124: 338-347.

Kiu H & Nicholson SE (2012). Biology and significance of the JAK/STAT signalling pathways. *Growth Factors*, 30: 88–106.

Kozma N, Halasz M, Polgar B, Poehlmann TG, Markert UR, Palkovics T, Szekeres-Bartho J (2006). Progesterone-induced blocking factor activates STAT6 via binding to a novel IL-4 receptor. *Journal of Immunology*, 176: 819–826.

Kyurkchiev D, Ivanova-Todorova E, Kyurkchiev SD (2010). New target cells of the immunomodulatory effects of progesterone. *Reproductive BioMedicine Online*, 21(Guo, Lasky, and Wu): 304–311.

Kyurkchiev D, Naydenov E, Tumangelova-Yuzeir K, Ivanova-Todorova E, Belemezova K, Bochev I, Kyurkchiev S. (2014). Cells isolated from human glioblastoma multiforme express progesterone-induced blocking factor (PIBF). *Cellular and Molecular Neurobiology*, 34: 479–489.

Hagan CR, Daniel AR, Dressing GE, Lange CA (2012). Role of phosphorylation in progesterone receptor signaling and specificity. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 357: 43–49.

Hovland AR, Powell RL, Takimoto GS, Tung L, Horwitz KB (1998). *The Journal of Biological Chemistry*, 273: 5455.

Labombarda F, González SL, Lima A, Roig P, Guennoun R, Schumacher M, De Nicola AF (2009). Effects of Progesterone on oligodendrocyte progenitors, oligodendrocyte transcription factors, and myelin proteins following spinal cord injury. *Glia*, 57: 884–897.

Lachmann M, Gelbmann D, Kálmán E, Polgár B, Buschle M, Von Gabain A, Nagy E (2004). PIBF (progesterone induced blocking factor) is overexpressed in highly proliferating cells and associated with the centrosome. *International Journal of Cancer*, 112: 51–60.

Lange CA, Shen T, Horwitz KB (2000). Phosphorylation of human progesterone receptors at serine-294 by mitogen-activated protein kinase signals their degradation by the 26S proteasome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97: 1032–1037

Leonhardt SA, Boonyaratanakornkit V, Edwards DP (2003). Progesterone receptor transcription and non-transcription signaling mechanisms. *Steroids*, 68: 761–770.

Levine JE, Chappell PE, Schneider JS, Sleiter NC, Szabo M (2001). Progesterone receptors as neuroendocrine integrators. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 22: 69–106.

Louis DN (2006). Molecular pathology of malignant gliomas. *Annual Review of Pathology*, 1: 97–117.



Louis DN, Perry A, Reifenberger G, Von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, Ellison DW (2016). The 2016 World Health Organization classification of tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathologica*, 131: 803–820.

Luchetti CG, Mikó E, Szekeres-Bartho J, Paz D, Motta B (2008). Dehydroepiandrosterone and metformin modulate progesterone-induced blocking factor (PIBF), cyclooxygenase 2 (COX2) and cytokines in early pregnant mice. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 111: 200–207.

Masui K, Mischel PS, Reifenberger G (2016). Molecular classification of gliomas. *Handbook of Clinical Neurology*, 1st ed, 134: 97–120.

Melcangi RC, Giatti S, Calabrese D, Pesaresi M, Cermenati G, Mitro N, Caruso D (2014). Levels and actions of progesterone and its metabolites in the nervous system during physiological and pathological conditions. *Progress in Neurobiology*, 113: 56–69.

Merk BC, Owens JL, Lopes M, Silva CM, Hussaini IM (2011). STAT6 expression in glioblastoma promotes invasive growth. *BMC Cancer*, 11: 184.

Miko E, Halasz M, Jericevic-Mulac B, Wicherek L, Arck P, Arató G, Szekeres-Bartho J (2011). Progesterone-induced blocking factor (PIBF) and trophoblast invasiveness. *Journal of Reproductive Immunology*, 90: 50–57.

Nelms K, Keegan AD, Zamorano J, Ryan JJ, Paul WE (1999). The IL-4 receptor: signaling mechanisms and biologic functions. *Annual Review of Immunology*, 17: 701–738.

Ostrom QT, Gittleman H, Fulop J, Liu M, Blanda R, Kromer C, Barnholtz-Sloan JS (2015). CBTRUS statistical report: Primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2008-2012. *Neuro-Oncology*, 17: iv1-iv62.

Paul SM, Purdy RH (1992). Neuroactive steroids. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 6: 2311–2322.

Patel B, Elguero S, Thakore S, Dahoud W, Bedaiwy M, Mesiano S (2014). Role of nuclear progesterone receptor isoforms in uterine pathophysiology. *Human Reproduction*, 1: 19.

Piña-Medina AG, Hansberg-Pastor V, González-Arenas A, Cerbón M, Camacho-Arroyo I (2016). Progesterone promotes cell migration, invasion and cofilin activation in human astrocytoma cells. *Steroids*, 105: 19–25.

Polgar B, Kispal G, Lachmann M, Paar C, Nagy E, Csere P, Szekeres-Bartho J (2003). Molecular cloning and immunologic characterization of a novel cDNA coding for progesterone-induced blocking factor. *Journal of Immunology*, 171: 5956–5963.

Raghupathy R, Al-Mutawa E, Al-Azemi M, Makhseed M, Azizieh F, Szekeres-Bartho J (2009). Progesterone-induced blocking factor (PIBF) modulates cytokine production by lymphocytes from women with recurrent miscarriage or preterm delivery. *Journal of Reproductive Immunology*, 80: 91–99.

Rahaman PC, Harbor O, Chernova GH, Barnett MA, Vogelbaum SJ (2002). Inhibition of constitutively active Stat3 suppresses proliferation and induces apoptosis in glioblastoma multiforme cells. *Oncogene*, 21: 8404–8413.

Riemenschneider MJ, Reifenberger G (2009). Gliomas. *Cancer Research*, 171: 3–24.

Schonberg DL, Lubelski D, Miller TE, Rich JN (2013). Brain tumor stem cells: Molecular characteristics and their impact on therapy. *Molecular Aspects of Medicine*, 39: 82–101.

Schumacher M, Guennoun R, Robert F, Carelli C, Gago N, Ghomari A, Gonzalez Deniselle MC, Gonzalez SL, Ibanez C, Labombarda F, Coirini H, Baulieu EE, De Nicola AF (2004). Local synthesis and dual actions of progesterone in the nervous system: neuroprotection and myelination. *Growth Hormone & IGF Research*, 14 Suppl A: S18–S33.

Schumacher M, Mattern C, Ghomari A, Oudinet JP, Liere P, Labombarda F, Guennoun R (2014). Revisiting the roles of progesterone and allopregnanolone in the nervous system: Resurgence of the progesterone receptors. *Progress in Neurobiology*, 113: 6–39.

Senft C, Priester M, Polacin M, Schröder K, Seifert V, Kögel D, Weissenberger J (2011). Inhibition of the JAK-2/STAT3 signaling pathway impedes the migratory and invasive potential of human glioblastoma cells. *Journal of Neuro-Oncology*, 101: 393–403.

Simoncini T, Genazzani AR (2003). Non-genomic actions of sex steroid hormones. *European Journal of Endocrinology*. 148: 281–292.

Stupp R, Mason WP, Van Den Bent MJ (2005). Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *The New England Journal of Medicine*, 352: 987–996.

Szekeres-Bartho J, Autran B, Debre P, Andreu G, Denver L, Chaouat G (1989). Immunoregulatory effects of a suppressor factor from healthy pregnant women's lymphocytes after progesterone induction. *Cellular Immunology*, 122: 281-294.

Szekeres-Bartho J, Barakonyi A, Par G, Polgar B, Palkovics T, Szereday L (2001).. Progesterone as an immunomodulatory molecule. *International Immunopharmacology*, 1: 1037–1048.

Szekeres-Bartho J, Csernus V, Hadnagy J, Pacsa AS (1983). Immunosuppressive effect of serum progesterone during pregnancy depends on the progesterone binding capacity of the lymphocytes. *Journal of Reproductive Immunology*, 5: 81-88

Szekeres-Bartho J, Par G, Dombay GY, Smart YC, Volgyi Z (1997). The antiabortive effect of progesterone-induced blocking factor in mice is manifested by modulating NK activity. *Cellular Immunology*, 177: 194–199.

Szekeres-Bartho J, Polgar B (2010). PIBF: The Double Edged Sword. Pregnancy and tumor. *American Journal of Reproductive Immunology*, 64: 77–86.

Tihan T, Bloomer MM (2010). Astrocytic neoplasms of the central nervous system and orbit: A morphologic perspective. *Seminars in Diagnostic Pathology*, 27(2): 114–121.

Wehling M (1994). Nongenomic actions of steroid hormones. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 5(January): 347–353.

Weller M, Fisher B, Taphoorn MJB, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Janzer RC (2005). Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *Cancer/Radiothérapie*, 9: 196–197.

### **13. Anexo**

13. 1. Artículo original en revista indizada

**Gutiérrez-Rodríguez A**, Hansberg-Pastor V, Camacho-Arroyo I (2016). Proliferative and invasive effects of progesterone-induced blocking factor in human glioblastoma cells. BioMed Research International. doi: 10.1155/2017/1295087

## Research Article

# Proliferative and Invasive Effects of Progesterone-Induced Blocking Factor in Human Glioblastoma Cells

Araceli Gutiérrez-Rodríguez,<sup>1</sup> Valeria Hansberg-Pastor,<sup>2</sup> and Ignacio Camacho-Arroyo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Unidad de Investigación en Reproducción Humana, Instituto Nacional de Perinatología-Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Ciudad Universitaria, Coyoacán, 04510 Ciudad de México, Mexico

<sup>2</sup>Facultad de Química, Departamento de Biología, UNAM, Ciudad Universitaria, Coyoacán, 04510 Ciudad de México, Mexico

Correspondence should be addressed to Ignacio Camacho-Arroyo; [camachorroyo@gmail.com](mailto:camachorroyo@gmail.com)

Received 8 August 2016; Revised 24 November 2016; Accepted 15 December 2016; Published 12 January 2017

Academic Editor: Jens Schittenhelm

Copyright © 2017 Araceli Gutiérrez-Rodríguez et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Progesterone-induced blocking factor (PIBF) is a progesterone ( $P_4$ ) regulated protein expressed in different types of high proliferative cells including astrocytomas, the most frequent and aggressive brain tumors. It has been shown that PIBF increases the number of human astrocytoma cells. In this work, we evaluated PIBF regulation by  $P_4$  and the effects of PIBF on proliferation, migration, and invasion of U87 and U251 cells, both derived from human glioblastomas. PIBF mRNA expression was upregulated by  $P_4$  (10 nM) from 12 to 24 h. Glioblastoma cells expressed two PIBF isoforms, 90 and 57 kDa. The content of the shorter isoform was increased by  $P_4$  at 24 h, while progesterone receptor antagonist RU486 (10  $\mu$ M) blocked this effect. PIBF (100 ng/mL) increased the number of U87 cells on days 4 and 5 of treatment and induced cell proliferation on day 4. Wound-healing assays showed that PIBF increased the migration of U87 (12–48 h) and U251 (24 and 48 h) cells. Transwell invasion assays showed that PIBF augmented the number of invasive cells in both cell lines at 24 h. These data suggest that PIBF promotes proliferation, migration, and invasion of human glioblastoma cells.

## 1. Introduction

Progesterone ( $P_4$ ) is a cholesterol-derived steroid hormone that is synthesized by the adrenal glands, gonads, and the central nervous system (CNS) [1].  $P_4$  participates in the growth of several types of cancer through the activation of its intracellular receptor (PR), which is a ligand-activated transcription factor [2, 3].  $P_4$  promotes the growth, migration, and invasion of human astrocytoma cells lines such as U373 (grade III), U87, and D54 (both grade IV or glioblastomas) [4–6]. In these cell lines,  $P_4$  effects are mostly mediated by PR, given that the treatment with the receptor antagonist, mifepristone (RU486), almost completely blocks hormone effects. One of the known PR target genes is the progesterone-induced blocking factor (PIBF) that was initially discovered in maternal lymphocytes where it functions as an immunomodulatory factor [7, 8].

Several PIBF isoforms are produced by alternative splicing; the most studied ones are the isoforms of 34, 57, 67, and 90 kDa [9–11]. The latter is the most abundant isoform expressed in most cells, which has been shown to be associated with the centrosome, suggesting a participation in cell cycle regulation [9]. The shorter PIBF isoforms present a tissue-specific expression and have been located in the intra- and extracellular compartments [9, 10]. These short isoforms have been proposed as ligands of the PIBF receptor/interleukin 4 receptor  $\alpha$  (PIBF-R/IL-4R $\alpha$ ) heterocomplex that activates diverse proliferative signaling pathways [12, 13]. The most studied pathway is the IL-4R/JAK1/STAT6 [10, 12, 14], associated with the differentiation of Th2 cells, to produce a cytokine specific pattern [15], and with tumor cell growth [16]. Besides, data from our laboratory have demonstrated that PIBF is released to the extracellular compartment and increases the number of U373 cells through the activation

of the IL-4R/JAK1/STAT6 pathway [10]. PIBF expression is induced by  $P_4$  and its production is a common feature during pregnancy [8, 14]. However, it is also synthesized by high proliferative cells such as the trophoblast, mesenchymal stem cells, and tumor cells [9, 14, 17].

PIBF has been associated with cancer due to its proximity to the susceptibility genes of breast cancer in chromosome 13 [9]. Several reports show that PIBF is overexpressed in biopsies of uterus, breast, stomach, and brain cancer [9, 18]. Besides, PIBF is highly expressed in several cancer cell lines derived from astrocytomas (U373) [10], cervix adenocarcinoma (HeLa), chronic myeloid leukemia (K562), ovary adenocarcinoma (OVCAR-3), and breast adenocarcinomas (T47D, SK-BR3, and MCF-7) [9]. In fact, high PIBF concentrations in urine (1000 ng/mL) are observed in patients with malignant tumors, which are almost fourfold higher than those observed during pregnancy (~270 ng/mL) [12, 14]. However, Check et al., 2015, reported that PIBF serum concentrations are not higher in patients with gynecological [19] or breast cancer compared to women with benign tumors [20, 21], possibly due to a mutation of BRCA1 gene that induces the degradation of PR by the proteasome 26S [22]. In these studies, an evaluation of intracytoplasmic PIBF concentrations to elucidate these different findings is suggested.

PIBF expression has been described in astrocytomas [10, 18] which are classified by the World Health Organization (WHO) into four grades (I–IV). Astrocytomas grade IV, also known as glioblastomas, represent the highest evolution grade and also the most frequent malignant brain tumors in humans [23]. Glioblastomas ability to invade several areas of the brain and their short-term recurrence causes the highest rate of death by brain tumors [24]. It has been reported that  $P_4$  is implicated in the invasive potential of glioblastomas [4]; however, the mechanisms involved in this effect are not completely understood. Interestingly, in a case report, the administration of RU486 resulted in a palliative effect and even extended the patient's life [25]. Glioblastomas are also highly immunosuppressive [26], probably through the secretion of immunomodulatory factors such as TGF- $\beta$  or PIBF [27, 28]. Interestingly, the latter causes a marked diminution of Th1/Th2 cells ratio during pregnancy [15, 29], leading to an immunosuppressive state, which may provide glioma cells with a mechanism of evasion from organism immune system and facilitate tumor progression [30]. Given that PIBF is induced by  $P_4$  and modulates different pathways involved in cell growth and inflammation, the aim of this study was to investigate the role of PIBF in cell proliferation, migration, and invasion of U87 and U251 cells derived from human glioblastomas.

## 2. Materials and Methods

**2.1. Cell Culture.** U87 and U251 (ATCC, VA, USA) cells derived from human glioblastomas were cultured in Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) with phenol red, supplemented with fetal bovine serum (FBS) (10%), pyruvate (1 mM), glutamine (2 mM), and nonessential amino acids

(0.1 nM) (Biowest, Nuaille, FRA); the culture was maintained at 37°C, under 95% humidity/5% CO<sub>2</sub> atmosphere. Cells were grown until reaching a 70–80% confluence.

**2.2. Treatments.** U87 and U251 cells were grown in phenol red-free DMEM medium (In Vitro S.A., CDMX, MEX) supplemented with FBS (10%) without hormones 24 hours before the following treatments: vehicle (cyclodextrin 0.02%),  $P_4$  coupled to cyclodextrin (10 nM), PR antagonist RU486 (10  $\mu$ M), and the combined treatment of  $P_4$  plus RU486. Recombinant PIBF (100 and 200 ng/mL) (Abnova, TP, TWN) was used for treating cells in the cell counting, proliferation, wound-healing, and transwell assays. Phenol red and hormone-free DMEM was used as the vehicle in these experiments. Recombinant PIBF shows isoforms with approximate molecular weights of 95, 60, and 40 kDa according to the manufacturer's specifications.

**2.3. Total RNA Extraction and RT-PCR.** To determine the effect of  $P_4$  on PIBF gene expression,  $5 \times 10^5$  cells were grown as described in the "Cell Culture" section and treated for 6, 12, and 24 h. Total RNA was isolated from U87 cells by the method based on guanidine isothiocyanate/phenol/chloroform extraction according to the TRIzol reagent manufacturer's protocol (Invitrogen, CA, USA). Isolated RNA was quantified using the spectrophotometer Nanodrop-2000 (Thermo Scientific, MA, USA) at 260 nm. 1  $\mu$ g of total RNA was used to synthesize the first-strand cDNA with the M-MLV reverse transcriptase (Thermo Scientific, MA, USA) following the manufacturer's instructions. 2  $\mu$ L of synthesized cDNA was used to amplify PIBF and the internal control 18S ribosomal RNA (rRNA) with the following specific primers: 5'-GACAGAGCCAATTCGCTATTAACAGACTCAACAGC-3' in the sense primer and 5'-GCTGAGTACAG-ATTAAGCTGAATTTTGTTCATCAG-3' in the antisense for PIBF, and for 18S amplification the sequences were 5'-CGCGTTCTATTTTGTGGT-3' in the sense and 5'-AGTCGGCATCGTTTATGGTC-3' in the antisense (Sigma-Aldrich, MO, USA). Negative controls without cDNA and with nonretrotranscribed RNA were included in all experiments. The PCR reaction was performed as follows: an initial PCR activation step at 94°C (5 min), 25 cycles of denaturation at 94°C (30 s), annealing at 68°C (30 s), and elongation at 72°C (30 s). A final extension cycle was performed at 72°C (5 min). The PCR products were separated by electrophoresis on a 1.5% agarose gel at 70 V for 120 min and stained with GelRed™ (Biotium, CA, USA). The gel image was captured under a UV transilluminator and analyzed for band densitometry using the ImageJ software (National Institute of Health, WA, USA). PIBF expression level was normalized to that of the internal control 18S rRNA.

**2.4. Western Blotting.** To determine the effect of  $P_4$  on PIBF protein content in the U87 cell line,  $5 \times 10^5$  cells were seeded in 6-well plates and treated for 12 and 24 h as described in the "Treatments" section. Total proteins were extracted with RIPA lysis buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 1% Triton, and 0.1% SDS) and quantified using the

spectrophotometer Nanodrop-2000 (Thermo Scientific, MA, USA) at 280 nm. 70  $\mu\text{g}$  of total lysate protein was separated on 7.5% SDS-PAGE at 70 V for 2 h. The proteins were transferred to nitrocellulose membranes (Millipore, MA, USA) at 60 mA for 2 h in semidry conditions. After blocking with 3% fat-free milk and 2% bovine serum albumin (BSA) at 4°C overnight, the membrane was incubated with an antibody against PIBF (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , sc-99129, Santa Cruz Biotechnology, TX, USA) at 4°C overnight. Blots were then incubated with an anti-rabbit secondary antibody conjugated to horseradish peroxidase (0.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , sc-2004, Santa Cruz Biotechnology, TX, USA) for 45 min at room temperature. In order to correct the differences in the amount of total protein loaded, membranes were incubated with glycine (0.1M, pH 2.5, 0.5% SDS) for 45 min at room temperature and afterwards with the  $\alpha$ -tubulin primary antibody (0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , sc-5286, Santa Cruz Biotechnology, TX, USA) at 4°C overnight. Blots were incubated with an anti-mouse secondary antibody conjugated to horseradish peroxidase (0.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , sc-2005, Santa Cruz Biotechnology, TX, USA) for 45 min. Chemiluminescence signals were detected exposing the membranes to Kodak Biomax Light Films (Sigma-Aldrich, MO, USA) using the peroxidase substrate SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity (Thermo Scientific, MA, USA). Blot images were captured using a Canon digital camera and the bands intensities were quantified with the ImageJ software (National Institute of Health, WA, USA).

**2.5. siRNA Transfection.** To determine the specificity of PIBF bands obtained by Western Blot, PIBF silencing was performed as follows:  $1 \times 10^5$  U87 cells were seeded in 6 wells in DMEM without antibiotics, and 24 h later the medium was replaced with phenol red and antibiotics-free DMEM, with a control siRNA that has no specific mRNA target sequence, and a PIBF siRNA (75 nM) (Santa Cruz Biotechnology, TX, USA), using the transfection reagent Lipofectamine RNAiMAX (Thermo Scientific, MA, USA). Cells were harvested 48 h after the transfection and a Western Blot analysis was performed as described in the “Western Blotting” section.

**2.6. Cell Counting.**  $1 \times 10^4$  U87 cells were seeded in 24-well plates and grown for 24 h; cells were treated for 5 days as described in “Treatments” section and harvested from incubation each day. The trypan blue dye exclusion assay was used to test the effect of PIBF on cell growth and viability, using a Neubauer chamber and an inverted microscope CKX41 (Olympus, TYO, JPN) at 40x magnification.

**2.7. Cell Proliferation Assay.** 5-bromo-2'-deoxy-uridine (BrdU) incorporation assay was used to test the proliferative effect of PIBF.  $4 \times 10^3$  U87 cells were seeded in chambered cell culture slides and maintained as described in the “Cell Culture” section. After 24 h, the medium was replaced for phenol red and hormone-free DMEM medium. Cells were treated for 4 days as described in “Treatments” section. After treatments, the bromo-2'-deoxy-uridine Labeling and Detection Kit I (Roche, BW, DE) was used according to

the manufacturer's protocol. Hoechst 33342 Fluorescent Dye (Thermo Scientific, MA, USA) was used to stain the DNA. The fluorescence signal was observed at dual-wave lengths of 486 and 515–565 nm in the fluorescence microscope Olympus Bx43F (Olympus, TYO, JPN). The number of cells with BrdU incorporation was obtained using the ImageJ software (National Institute of Health, WA, USA) and the percentage of cells positive for BrdU was calculated considering the total number of cells stained with Hoechst.

**2.8. Migration Assay.** The wound-healing assay was used to examine the effect of PIBF on glioblastoma cell migration.  $3 \times 10^5$  U87 cells and  $2 \times 10^5$  U251 cells were seeded in six-well plates and grown until reaching a 70–80% confluence; then the medium was changed for phenol red-free DMEM medium supplemented with fetal bovine serum (10%) without hormones. 24 h later, when the monolayer was absolutely confluent, two parallel scratches by well were made with a 200  $\mu\text{L}$  pipet tip. The detached cells were washed by aspiration. Cells were incubated with DNA synthesis inhibitor cytosine  $\beta$ -D-arabinofuranoside hydrochloride (10  $\mu\text{M}$ , Ara-C; Sigma-Aldrich, MO, USA) for 1 h prior to PIBF treatments to avoid cell proliferation. Images of the scratch area were captured with an Infinity 1-2C camera (Lumenera, ON, CAN) attached to an inverted microscope CKX41 (Olympus, TYO, JPN) at 40x magnification at 0, 3, 6, 12, 24, and 48 h. At 24 h medium, treatments, and Ara-C were replaced. Three random fields were selected to count the number of cells that migrated in the scratch area using the ImageJ software (National Institute of Health, WA, USA).

**2.9. Invasion Assay.** To evaluate the effect of PIBF on cell invasion, transwell invasion assays were performed. 1 mL of Matrigel (Sigma-Aldrich, MO, USA), diluted in phenol red and FBS-free DMEM at a final concentration of 2 mg/mL, was added to the transwell inserts (8.0  $\mu\text{m}$  membrane; Corning, USA) placed on six-well plates and incubated for 24 hours at 37°C, under 95% humidity/5% CO<sub>2</sub> atmosphere.  $4 \times 10^5$  U87 cells and  $3 \times 10^5$  U251 cells cultured in phenol red and hormone-free DMEM medium were suspended in 1.5 mL of phenol red and FBS-free DMEM that included 100 ng/mL of recombinant PIBF and 10  $\mu\text{M}$  Ara-C. Cells were plated on the matrigel and phenol red-free DMEM medium supplemented with fetal bovine serum (10%) with hormones was added to the bottom of the well as chemoattractant. The plate was incubated for 24 h, then the matrigel was removed, and the cells were fixed with paraformaldehyde (4%) and stained with crystal violet (1%). Images of 5 random fields of each insert were captured with an Infinity 1-2C camera (Lumenera, ON, CAN) attached to an inverted microscope CKX41 (Olympus, TYO, JPN) at 40x magnification, and the number of invasive cells was counted using the ImageJ software (National Institute of Health, WA, USA).

**2.10. Statistical Analysis.** All data were analyzed and plotted using the GraphPad Prism 5.0 software (GraphPad Software, CA, USA). A one-way ANOVA was used for Western Blot

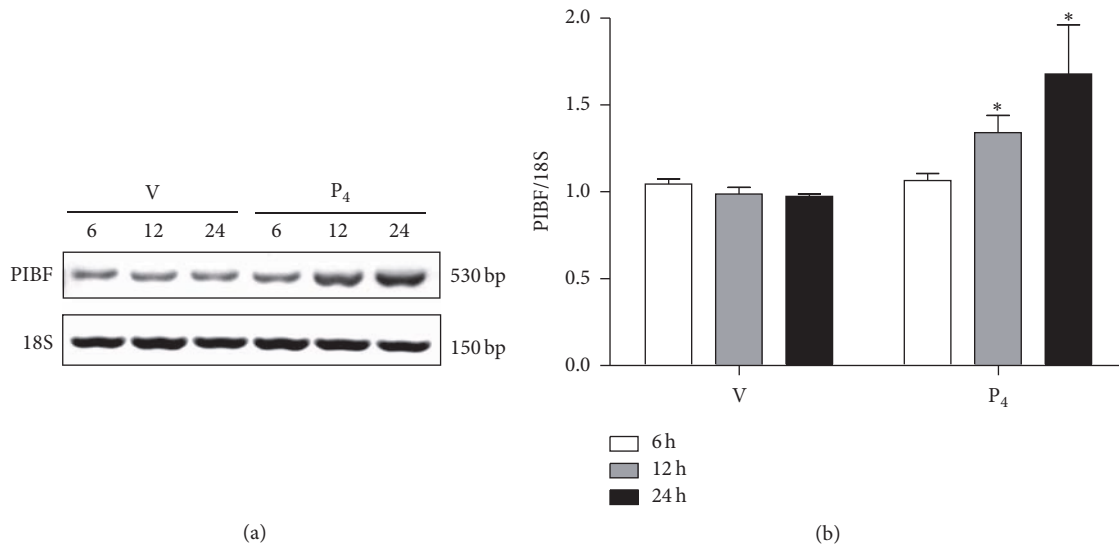


FIGURE 1: P<sub>4</sub> regulates PIBF expression in glioblastoma cells. PIBF gene expression was evaluated by RT-PCR in U87 cells treated with vehicle (V, cyclodextrin 0.02%) and P<sub>4</sub> (10 nM) for 6, 12, and 24 h. (a) Representative image of PIBF gene expression (530 bp) at different times of treatment and the respective expression control gene 18S rRNA (150 bp). (b) Densitometric analysis of three independent experiments; PIBF expression values were normalized to those of the control gene 18S rRNA. The data are expressed as the mean ± S.E.M. with  $n = 3$ ; \*  $p < 0.05$  versus vehicle.

experiments and a two-way ANOVA was used for cell counting and migration assays, followed by the Bonferroni post hoc test in all cases. Data from the RT-PCR, proliferation, and invasion assays were analyzed by a two-tail unpaired Student's *t*-test. A value of  $p < 0.05$  was considered statistically significant as stated in the figure legends.

### 3. Results

**3.1. PIBF Gene Expression Is Regulated by P<sub>4</sub>.** To assess the P<sub>4</sub>-mediated regulation of PIBF in U87 human glioblastoma cell line, we performed RT-PCR using cells treated with vehicle (cyclodextrin 0.02%) and P<sub>4</sub> (10 nM) for 6, 12, and 24 h. A specific fragment of 530 bp was amplified in U87 cells. P<sub>4</sub> treatment did not modify PIBF expression at 6 h, but at 12 and 24 h it significantly increased its expression when compared to the vehicle (Figures 1(a) and 1(b)).

**3.2. P<sub>4</sub> Upregulates PIBF 57 kDa Isoform Content.** Several PIBF isoforms are produced by alternative mRNA splicing and particularly the 90 kDa isoform is frequently overexpressed in cancer cells [9, 10, 18]. We first evaluated if PIBF isoforms were expressed in U87 cells and also if their content was regulated by P<sub>4</sub>. We detected by Western Blot two main isoforms, the largest one of 90 kDa and a shorter one of 57 kDa (Figure 2). In U87 cells, the 90 kDa isoform was the most abundant one. P<sub>4</sub> treatment had no effects on PIBF isoforms content at 12 h (Figure 2(a)), while at 24 h we observed an increase in the content of the 57 kDa isoform that was blocked by RU486 (Figure 2(b)), suggesting its regulation through PR. The silencing of both PIBF isoforms with siRNAs reduced the

intensity of PIBF bands 70%, corroborating the specificity of the bands recognized by the used antibody (Figure 2(c)).

**3.3. Cell Number and Proliferation Are Increased by PIBF.** PIBF (100 and 200 ng/mL) increased the number of cells on days 4 (47 and 42%, resp.) and 5 (36 and 31%, resp.) (Figure 3(a)) as compared with vehicle. None of the treatments had any effect on cell viability (Figure 3(b)). A BrdU incorporation assay was utilized in order to investigate whether the increase in the number of U87 cells by PIBF was due to an augment in cell proliferation. The low PIBF concentration (100 ng/mL) was used in these experiments and administered during 4 days. PIBF treatment enhanced by 30% the BrdU incorporation in U87 cells (Figures 3(c) and 3(d)).

**3.4. PIBF Induces Cell Migration.** To evaluate if PIBF modifies the migration capabilities of U87 and U251 cells, a wound-healing assay was performed. During the experiment, the DNA synthesis inhibitor Ara-C was used to discard that an increase in the number of migrating cells was due to cell proliferation. The treatments of PIBF (100 and 200 ng/mL) were added for 48 h, and the respective images of the migrating cells were taken at 0, 3, 6, 12, 24, and 48 h (Figures 4(a) and 4(b)). PIBF (100 ng/mL) increased the number of U87 and U251 migrating cells from 12 to 48 h and at 24 h, respectively. Interestingly, the highest concentration of PIBF (200 ng/mL) augmented the number of migrating U251 cells at 48 h, without effects on U87 cells (Figures 4(a) and 4(b)).

**3.5. PIBF Increases the Number of Invasive Cells.** To evaluate the effect of PIBF on the invasion capability of U87 and



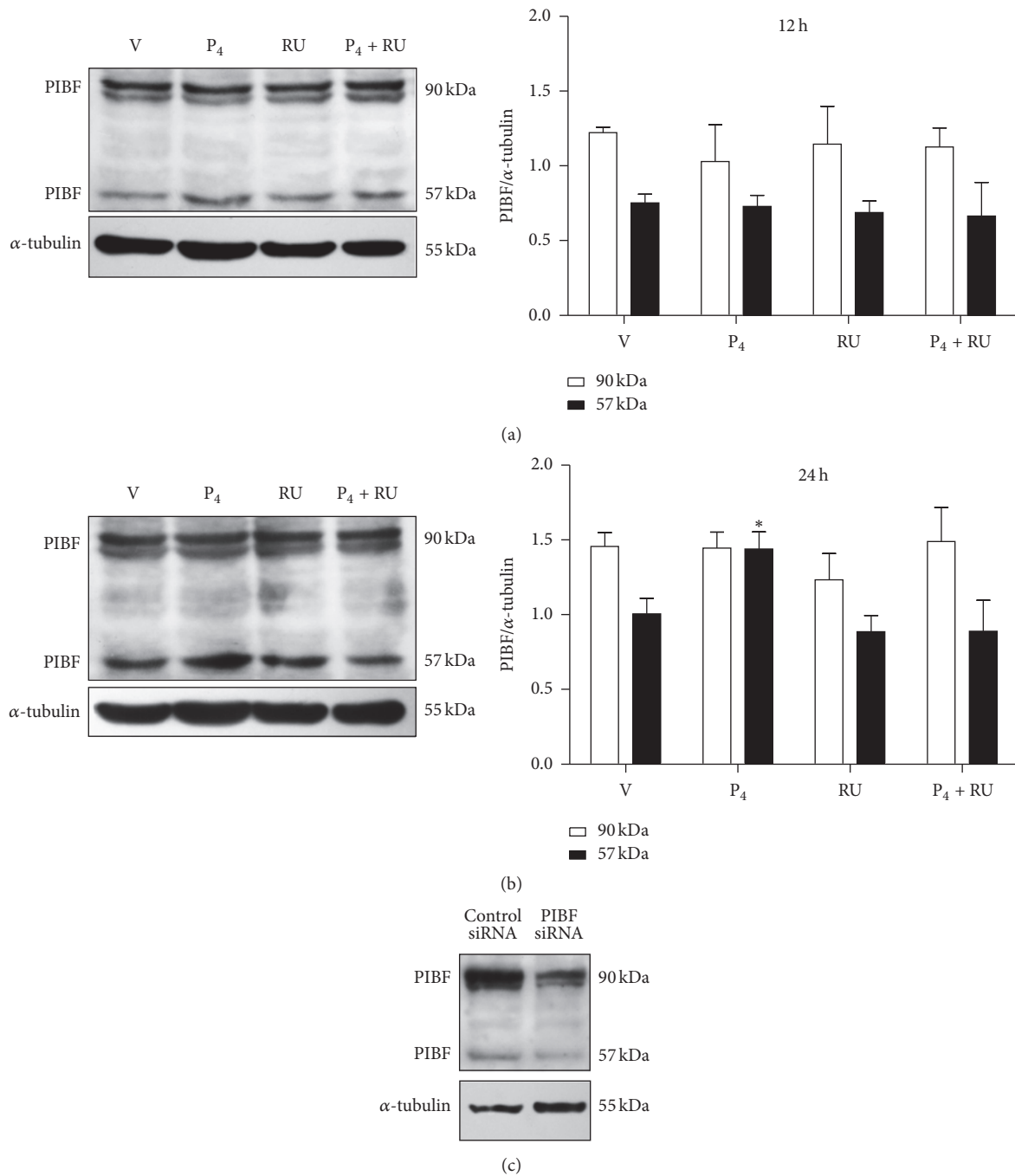


FIGURE 2: PIBF (57 kDa) isoform is regulated by P<sub>4</sub> in glioblastoma cells. Western Blot for PIBF protein was performed in U87 cells treated with vehicle (V, cyclodextrin 0.02%), P<sub>4</sub> (10 nM), RU486 (10 μM), and P<sub>4</sub> plus RU486 (P<sub>4</sub> + RU) for 12 and 24 h. Representative images of PIBF isoforms content are shown with their respective densitometric analysis after 12 h (a) and 24 h (b) of treatment. For the densitometric analysis, PIBF values were corrected with those of the internal control, α-tubulin. The data are expressed as the mean ± S.E.M. with n = 4; \*p < 0.05 versus the other treatment groups. (c) PIBF expression was silenced using a specific siRNA and a control siRNA that lacks any known mRNA target sequence. The image shows the reduction of both PIBF isoforms as evaluated by Western Blot.

U251 cells, we used the concentration of 100 ng/mL that induced an increase in cell migration in both cell lines at 24 h. Transwell assays were performed with cells treated with PIBF for 24 h; the medium was used as the vehicle. The images were captured from five random fields as it is shown in Figure 5(a). As in the case of migration, PIBF significantly increased the number of U87 (50%) and U251 (30%) invasive

cells, in comparison with the vehicle (Figures 5(a) and 5(b)).

#### 4. Discussion

Glioblastoma is the most common and aggressive brain tumor in humans; it has a high rate of mortality due to

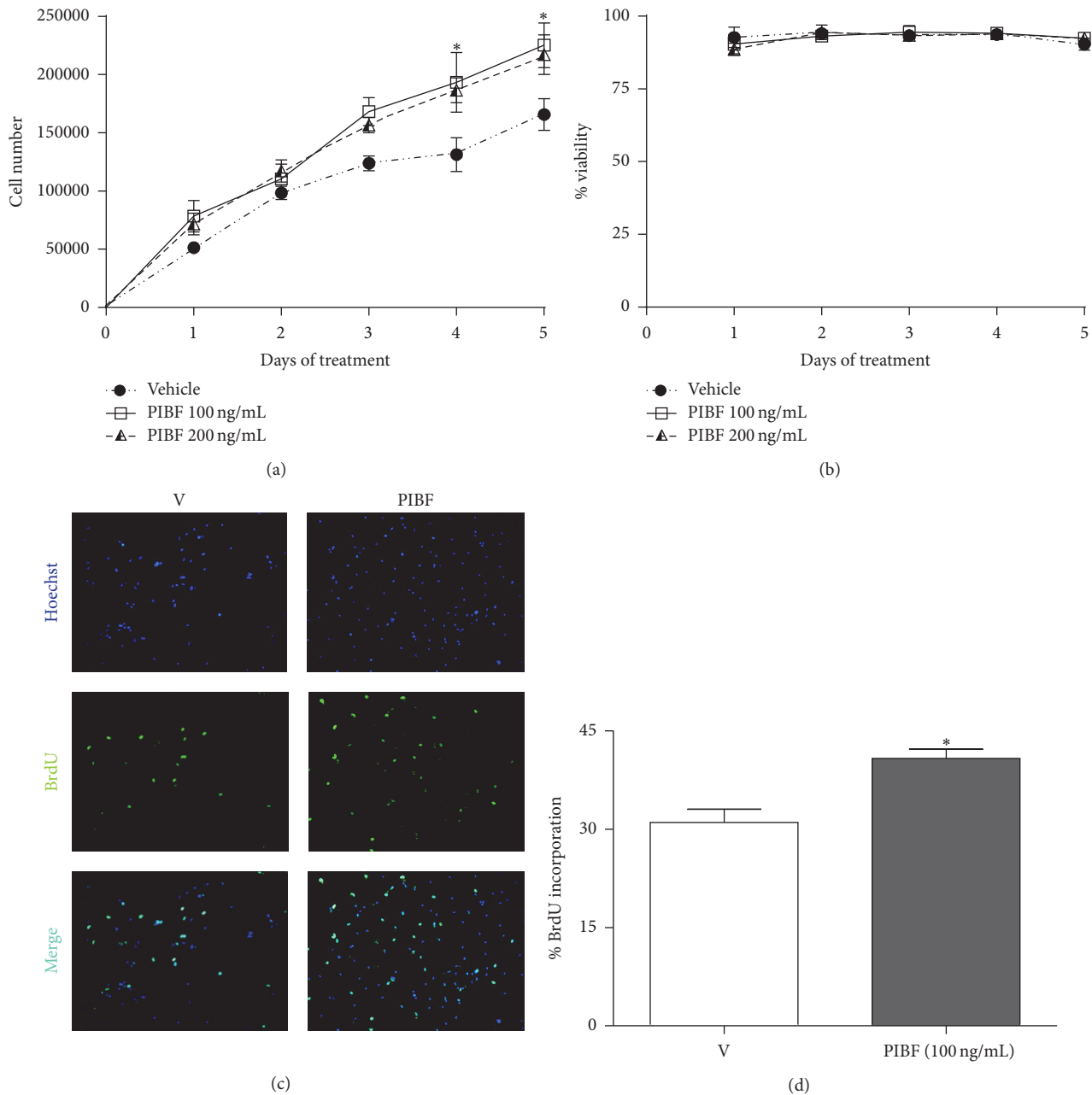


FIGURE 3: PIBF increases proliferation and the number of U87 cells. Cells were treated with recombinant PIBF (100 and 200 ng/mL) during 5 days, while the medium was used as the vehicle (V). Cells were harvested each day to determine the number of cells (a) and the cell viability (b) by using the trypan blue dye exclusion method. Cell proliferation was measured after the treatment of PIBF (100 ng/mL) during 4 days. Representative immunofluorescence images of cell nuclei (Hoechst stain, upper panel), BrdU positive cells (middle panel), and the merged image (lower panel) are shown (c). The graph shows the percentage of cells incorporating BrdU (d). The data were obtained from three independent experiments and are expressed as the mean  $\pm$  S.E.M. \* $p < 0.05$  versus vehicle.

its uncontrollable growth, its ability to infiltrate the adjacent tissue, and its short-term recurrence [24]. The current treatments neither improve the patient's life quality nor extend their survival time [31, 32]. Data from our laboratory have demonstrated that  $P_4$  induces both in vitro and in vivo glioblastoma cell proliferation and invasion partly through the activation of PR [4–6], but the mechanisms implicated in these effects are not well understood. There

is evidence that very high concentrations of  $P_4$  (40 and 80  $\mu$ M) alone or in combination with temozolomide (TMZ, 50 and 100  $\mu$ M), the most used chemotherapeutic agent for glioma treatment, decrease the proliferation and migration in different cell lines derived from human glioblastomas, and this decrease was not blocked by RU486. However, in the same studies, lower concentrations (0.1 to 5  $\mu$ M) of  $P_4$  increase cell viability/proliferation of human glioblastoma

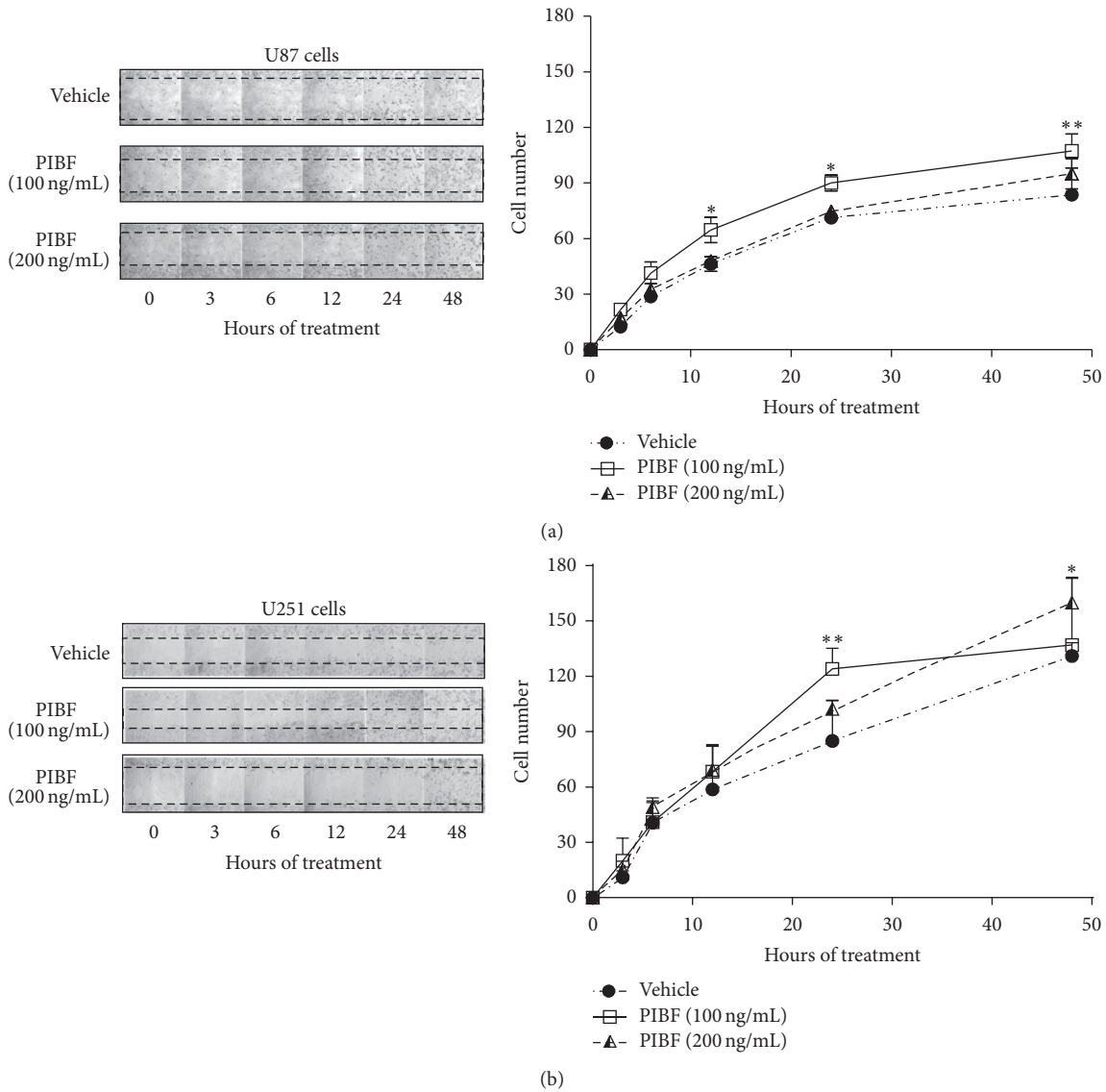


FIGURE 4: Migration of glioblastoma cells is enhanced by PIBF. Wound-healing assay was performed to evaluate the migration capabilities of U87 and U251 cells upon PIBF exposure. Cells were treated with the recombinant PIBF (100 and 200 ng/mL) for 48 h while the medium was used as the vehicle (V). (a) and (b) show representative images of the wound areas taken at 0, 3, 6, 12, 24, and 48 h after treatments in U87 and U251 cells, respectively, in the left panels. The graphs represent the number of cells that migrated into the wound area at the given time of treatment; the data were obtained from four independent experiments and are expressed as the mean  $\pm$  S.E.M.; \*  $p < 0.01$  and \*\*  $p < 0.001$  versus vehicle.

cells through PR activation [33, 34], consistent with our previous reports. These differential effects could be due to the activation of distinct signaling mechanisms by  $P_4$ , depending on its concentration. Further experiments with low and high concentrations of  $P_4$  and PIBF, alone and with TMZ, are needed to elucidate this opposed effect.

There are reports that show an increase of PIBF serum concentration induced by  $P_4$  in both healthy women and those with different gynecological diseases [35]. In contrast, there is evidence indicating that, in MCF-7 breast cancer cells,  $P_4$  is not able to increase the expression of PIBF [9]. In this study, we demonstrated that  $P_4$  significantly increases PIBF gene expression at 12 h and this effect lasted for 24 h.

Interestingly,  $P_4$  increases the expression of PIBF from 1 h to 24 h in U373 human astrocytoma cell line (now known as U251 glioblastoma cell line after a short tandem repeat-PCR genotyping) [10], indicating a differential hormone regulation of PIBF expression depending on cell context in human glioblastomas.

PIBF has several isoforms produced by alternative splicing [9, 36] but in tumor cells; these isoforms have not been fully characterized. In U87 cells we observed two isoforms: the 90 kDa protein encoded by the full-length mRNA and a shorter isoform of 57 kDa, both found by González-Arenas et al. (2014) in astrocytoma cells as well [10]. The largest isoform is mainly localized in the nucleus, and it is associated with

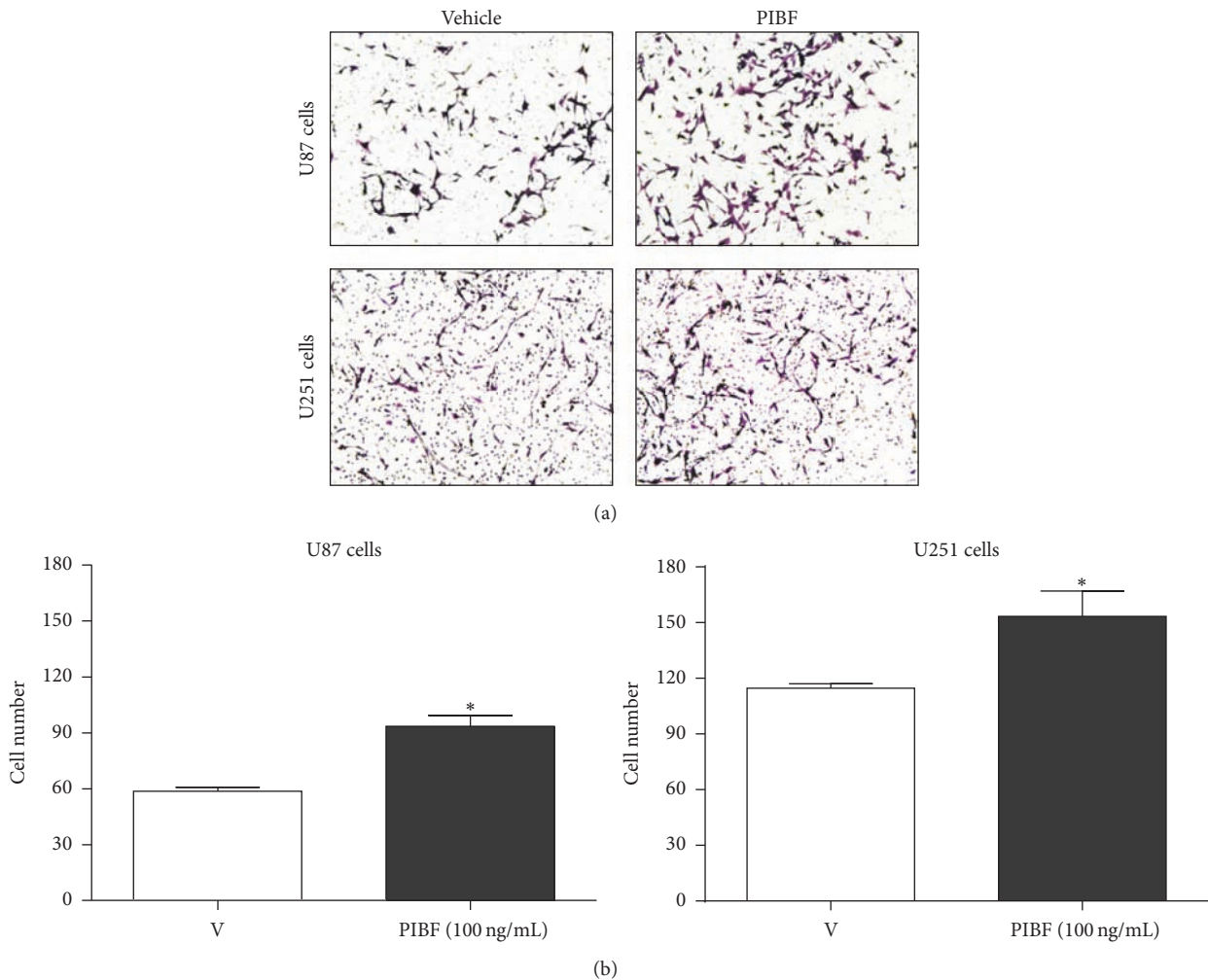


FIGURE 5: PIBF induces invasion of U87 and U251 cells. The number of invasive cells after PIBF treatment was evaluated by a transwell invasion assay. Cells were treated with recombinant PIBF (100 ng/mL) for 24 h, while the medium was used as the vehicle. (a) Representative images of the invasive cells after PIBF treatment in both cell lines. (b) The graph shows the number of invasive cells from four independent experiments. The data are expressed as the mean  $\pm$  S.E.M.; \*  $p < 0.01$  versus vehicle.

the centrosome, while the other shorter isoforms have been found in the intra- and extracellular compartments, and it is suggested they function in an autocrine mode [9, 10]. In U87 cells we did not observe changes in the content of the full-length PIBF protein upon treatment with  $P_4$ , but it increased the 90 kDa protein content in U373 cells (now known as U251) [10]. Remarkably, the content of 57 kDa protein was upregulated at 24 h by  $P_4$  in U87 cells but not in U251 cells [10]. In both tumor cell lines the inducing effect of the hormone was blocked by the PR antagonist RU486, suggesting its regulation through PR. Further experiments are needed to evaluate the processes involved in this differential regulation of PIBF expression depending on the glioblastoma cell line.

PIBF expression has been described in several cells with a high proliferation rate [9, 17, 37]. It has been suggested that PIBF isoforms act as ligands implicated in the activation of proliferation signaling pathways including JAK1/STAT6 [9, 10, 12, 38], through the interaction with a receptor heterocomplex consisting of PIBF-R, which is attached to

the plasma membrane by a glycosylphosphatidylinositol [13], and membrane receptor IL-4R $\alpha$  [10, 12]. In previous studies, PIBF (200 ng/mL) increased the number of astrocytoma cells through the activation of the IL-4R $\alpha$ /JAK1/STAT6 pathway [10]. In this work, we observed that PIBF induced cell proliferation, which was reflected in an increase in the number of U87 cells, probably by activating this same pathway.

The activation of JAK2/STAT3 pathway, which is over-activated in glioblastomas, promotes cell migration and invasion in several types of cancer [39, 40]. Interestingly, in the HT-1080 human fibrosarcoma cell line, it has been reported that PIBF is implicated in the augment of STAT3 phosphorylation [11]. In this study, we observed that PIBF (100 ng/mL) enhances the migration of glioblastoma cells at 12 and 24 h in U87 and U251 cells, respectively. Interestingly, chromatin immunoprecipitation assays in HT-1080 cells demonstrated that PIBF binds the promoter regions of IL-6 [11], an overexpressed cytokine in glioblastomas that acts as a ligand of the JAK2/STAT3 pathway [26, 41]. Therefore,

the overactivation of this pathway by PIBF could be a possible mechanism underlying its effects on cell migration.

PIBF also binds the promoter region of epidermal growth factor (EGF) gene in human fibrosarcoma cells [11]. EGF through its receptor (EGFR), which is frequently overexpressed in glioblastomas [42], promotes the transcription of genes associated with the extracellular matrix proteolysis such as matrix metalloproteases 2 and 9 (MMP-2 and 9) [11]. In this study, we observed that the treatment of PIBF (100 ng/mL) augmented the invasive capability of both cell lines at 24 h. Taking into consideration that PIBF acts as a transcriptional factor [11], we suggest a possible role of PIBF in regulating the expression of several target genes such as IL-6 and EGF that could be associated with the invasive effects of glioblastoma cells. However, it is still unknown which of the PIBF isoforms promote the cell migration and invasion of glioblastoma cells.

## 5. Conclusions

In summary, our data suggest that P<sub>4</sub> differentially upregulates PIBF expression by PR activation depending on the glioblastoma cell line and that PIBF increases glioblastoma cell proliferation, migration, and invasion, indicating an important role of this protein in the regulation of the mechanisms involved in tumor progression.

## Competing Interests

The authors declare that they have no competing interests.

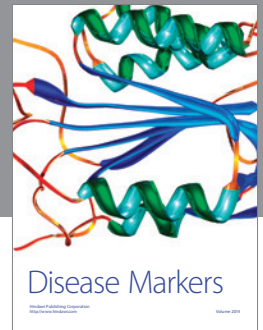
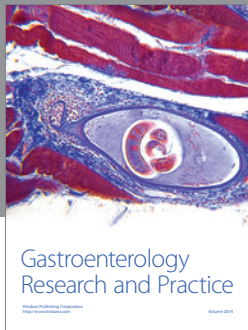
## Acknowledgments

This work was supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Mexico, Grant no. 250866, and by Project PAPIIT IN201414, DGAPA, UNAM, Mexico.

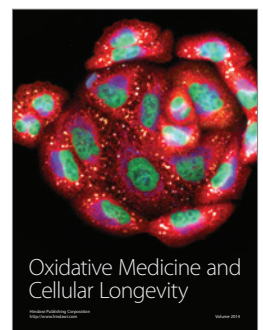
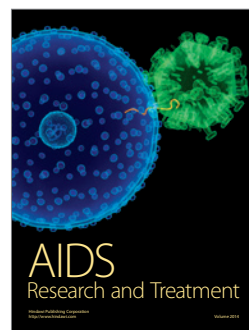
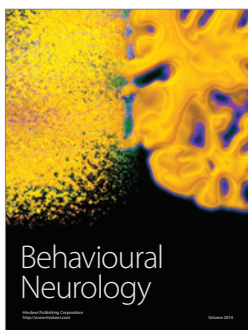
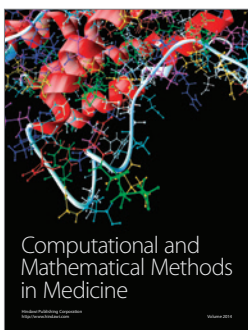
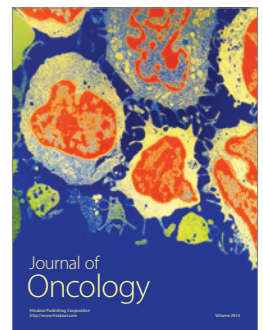
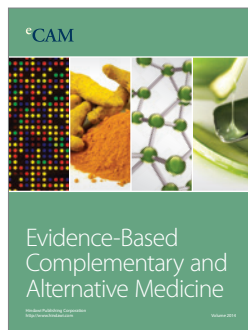
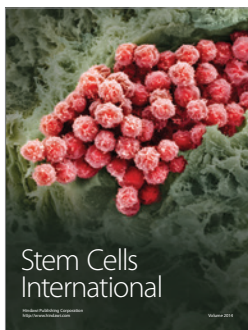
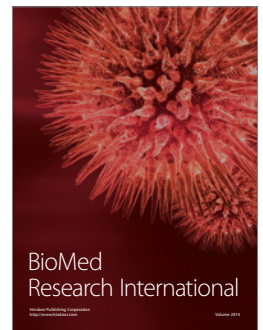
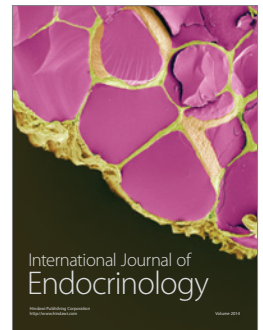
## References

- [1] M. Schumacher, R. Guennoun, F. Robert et al., "Local synthesis and dual actions of progesterone in the nervous system: neuroprotection and myelination," *Growth Hormone and IGF Research*, vol. 14, pp. S18–S33, 2004.
- [2] M. Rodríguez-Dorantes and I. Camacho-Arroyo, "Transcriptional activity regulated by progesterone receptor isoforms," *Molecular Endocrinology*, vol. 2006, no. 2, pp. 25–38, 2006.
- [3] E. Cabrera-Muñoz, A. González-Arenas, M. Saqui-Salces et al., "Regulation of progesterone receptor isoforms content in human astrocytoma cell lines," *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 113, no. 1-2, pp. 80–84, 2009.
- [4] A. G. Piña-Medina, V. Hansberg-Pastor, A. González-Arenas, M. Cerbón, and I. Camacho-Arroyo, "Progesterone promotes cell migration, invasion and cofilin activation in human astrocytoma cells," *Steroids*, vol. 105, pp. 19–25, 2016.
- [5] L. Germán-Castelán, J. Manjarrez-Marmolejo, A. González-Arenas, M. G. González-Morán, and I. Camacho-Arroyo, "Progesterone induces the growth and infiltration of human astrocytoma cells implanted in the cerebral cortex of the rat," *BioMed Research International*, vol. 2014, Article ID 393174, 8 pages, 2014.
- [6] G. González-Agüero, A. A. Gutiérrez, D. González-Espinosa et al., "Progesterone effects on cell growth of U373 and D54 human astrocytoma cell lines," *Endocrine*, vol. 32, no. 2, pp. 129–135, 2007.
- [7] J. Szekeres-Bartho, B. Autran, P. Debre, G. Andreu, L. Denver, and G. Chaouat, "Immunoregulatory effects of a suppressor factor from healthy pregnant women's lymphocytes after progesterone induction," *Cellular Immunology*, vol. 122, no. 2, pp. 281–294, 1989.
- [8] R. Druckmann and M.-A. Druckmann, "Progesterone and the immunology of pregnancy," *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 97, no. 5, pp. 389–396, 2005.
- [9] M. Lachmann, D. Gelbmann, E. Kálmán et al., "PIBF (progesterone induced blocking factor) is overexpressed in highly proliferating cells and associated with the centrosome," *International Journal of Cancer*, vol. 112, no. 1, pp. 51–60, 2004.
- [10] A. González-Arenas, P. Valadez-Cosmes, C. Jiménez-Arellano, M. López-Sánchez, and I. Camacho-Arroyo, "Progesterone-induced blocking factor is hormonally regulated in human astrocytoma cells, and increases their growth through the IL-4R/JAK1/STAT6 pathway," *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 144, pp. 463–470, 2014.
- [11] M. Halasz, B. Polgar, G. Berta, L. Czimbalek, and J. Szekeres-Bartho, "Progesterone-induced blocking factor differentially regulates trophoblast and tumor invasion by altering matrix metalloproteinase activity," *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 70, no. 23, pp. 4617–4630, 2013.
- [12] N. Kozma, M. Halasz, B. Polgar et al., "Progesterone-induced blocking factor activates STAT6 via binding to a novel IL-4 receptor," *The Journal of Immunology*, vol. 176, no. 2, pp. 819–826, 2006.
- [13] C. de la Haba, J. R. Palacio, T. Palkovics, J. Szekeres-Barthó, A. Morros, and P. Martínez, "Oxidative stress effect on progesterone-induced blocking factor (PIBF) binding to PIBF-receptor in lymphocytes," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)—Biomembranes*, vol. 1838, no. 1, pp. 148–157, 2014.
- [14] J. Szekeres-Bartho and B. Polgar, "PIBF: the double edged sword. Pregnancy and tumor," *American Journal of Reproductive Immunology*, vol. 64, no. 2, pp. 77–86, 2010.
- [15] J. Szekeres-Bartho, M. Halasz, and T. Palkovics, "Progesterone in pregnancy; receptor-ligand interaction and signaling pathways," *Journal of Reproductive Immunology*, vol. 83, no. 1-2, pp. 60–64, 2009.
- [16] B. C. Merk, J. L. Owens, M.-B. S. Lopes, C. M. Silva, and I. M. Hussaini, "STAT6 expression in glioblastoma promotes invasive growth," *BMC Cancer*, vol. 11, article 184, 2011.
- [17] C. Anderle, A. Hammer, B. Polgár et al., "Human trophoblast cells express the immunomodulator progesterone-induced blocking factor," *Journal of Reproductive Immunology*, vol. 79, no. 1, pp. 26–36, 2008.
- [18] D. Kyurkchiev, E. Naydenov, K. Tumangelova-Yuzeir et al., "Cells isolated from human glioblastoma multiforme express progesterone-induced blocking factor (PIBF)," *Cellular and Molecular Neurobiology*, vol. 34, no. 4, pp. 479–489, 2014.
- [19] J. H. Check, M. Sarumi, A. DiAntonio, K. Hunter, G. Simpkins, and M. Duroseau, "Serum levels of the progesterone induced blocking factor do not precipitously rise in women with gynecologic cancer in contrast to women exposed to progesterone," *Clinical and Experimental Obstetrics and Gynecology*, vol. 42, no. 5, pp. 563–567, 2015.

- [20] J. H. Check, A. Rosenberg, A. DiAntonio, H. Rui, R. Cohen, and G. DiAntonio, "Abstract 1281: serum levels of the immunomodulatory protein, the progesterone induced blocking factor (PIBF) are not higher in women with progesterone (P) receptor (R) positive vs. negative breast cancer," *Cancer Research*, vol. 75, supplement 15, pp. 1281–1281, 2015.
- [21] J. H. Check, M. P. Dougherty, G. DiAntonio, J. Vaniver, M. Duroseau, and M. D. Srivastava, "Abstract 1282: comparison of serum progesterone levels of the immunomodulatory protein, the progesterone induced blocking factor, in people with BRCA-2 mutations associated with and not associated with a high risk of cancer," *Cancer Research*, vol. 75, no. 15, article 1282, 2015.
- [22] V. Calvo and M. Beato, "BRCA1 counteracts progesterone action by ubiquitination leading to progesterone receptor degradation and epigenetic silencing of target promoters," *Cancer Research*, vol. 71, no. 9, pp. 3422–3431, 2011.
- [23] D. N. Louis, A. Perry, G. Reifenberger et al., "The 2016 world health organization classification of tumors of the central nervous system: a summary," *Acta Neuropathologica*, vol. 131, no. 6, pp. 803–820, 2016.
- [24] F. B. Furnari, T. Fenton, R. M. Bachoo et al., "Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment," *Genes and Development*, vol. 21, no. 21, pp. 2683–2710, 2007.
- [25] J. H. Check, C. Wilson, R. Cohen, and M. Sarumi, "Evidence that mifepristone, a progesterone receptor antagonist, can cross the blood brain barrier and provide palliative benefits for glioblastoma multiforme grade IV," *Anticancer Research*, vol. 34, no. 5, pp. 2385–2388, 2014.
- [26] A. Authier, K. J. Farrand, K. W. R. Broadley et al., "Enhanced immunosuppression by therapy-exposed glioblastoma multiforme tumor cells," *International Journal of Cancer*, vol. 136, no. 11, pp. 2566–2578, 2015.
- [27] J. H. Check, P. Nazari, J. Goldberg, W. Yuen, and D. Angotti, "A model for potential tumor immunotherapy based on knowledge of immune mechanisms responsible for spontaneous abortion," *Medical Hypotheses*, vol. 57, no. 3, pp. 337–343, 2001.
- [28] A. Waziri, "Glioblastoma-derived mechanisms of systemic immunosuppression," *Neurosurgery Clinics of North America*, vol. 21, no. 1, pp. 31–42, 2010.
- [29] R. Raghupathy, E. Al-Mutawa, M. Al-Azemi, M. Makhseed, F. Azizieh, and J. Szekeres-Bartho, "Progesterone-induced blocking factor (PIBF) modulates cytokine production by lymphocytes from women with recurrent miscarriage or preterm delivery," *Journal of Reproductive Immunology*, vol. 80, no. 1-2, pp. 91–99, 2009.
- [30] J. H. Check, E. Dix, and L. Sansoucie, "Support for the hypothesis that successful immunotherapy of various cancers can be achieved by inhibiting a progesterone associated immunomodulatory protein," *Medical Hypotheses*, vol. 72, no. 1, pp. 87–90, 2009.
- [31] L. Cheng, S. Bao, and J. N. Rich, "Potential therapeutic implications of cancer stem cells in glioblastoma," *Biochemical Pharmacology*, vol. 80, no. 5, pp. 654–665, 2010.
- [32] M. J. Riemenschneider and G. Reifenberger, "Astrocytic tumors," *Recent Results in Cancer Research*, vol. 171, pp. 3–24, 2009.
- [33] F. Atif, S. Yousuf, and D. G. Stein, "Anti-tumor effects of progesterone in human glioblastoma multiforme: role of PI3K/Akt/mTOR signaling," *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 146, pp. 62–73, 2015.
- [34] F. Atif, N. R. Patel, S. Yousuf, and D. G. Stein, "The synergistic effect of combination progesterone and temozolomide on human glioblastoma cells," *PLoS ONE*, vol. 10, no. 6, Article ID e0131441, 2015.
- [35] R. A. Cohen, J. H. Check, and M. P. Dougherty, "Evidence that exposure to progesterone alone is a sufficient stimulus to cause a precipitous rise in the immunomodulatory protein the progesterone induced blocking factor (PIBF)," *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, vol. 33, no. 2, pp. 221–229, 2016.
- [36] A. Bogdan, B. Polgar, and J. Szekeres-Bartho, "Progesterone induced blocking factor isoforms in normal and failed murine pregnancies," *American Journal of Reproductive Immunology*, vol. 71, no. 2, pp. 131–136, 2014.
- [37] M. D. Srivastava, A. Thomas, B. I. S. Srivastava, and J. H. Check, "Expression and modulation of progesterone induced blocking factor (PIBF) and innate immune factors in human leukemia cell lines by progesterone and mifepristone," *Leukemia and Lymphoma*, vol. 48, no. 8, pp. 1610–1617, 2007.
- [38] N. Kozma, M. Halasz, T. Palkovics, and J. Szekeres-Bartho, "The progesterone-induced blocking factor modulates the balance of PKC and intracellular Ca<sup>++</sup>," *American Journal of Reproductive Immunology*, vol. 55, no. 2, pp. 122–129, 2006.
- [39] C. Senft, M. Priester, M. Polacin et al., "Inhibition of the JAK-2/STAT3 signaling pathway impedes the migratory and invasive potential of human glioblastoma cells," *Journal of Neuro-Oncology*, vol. 101, no. 3, pp. 393–403, 2011.
- [40] M. Priester, E. Copanaki, V. Vafaizadeh et al., "STAT3 silencing inhibits glioma single cell infiltration and tumor growth," *Neuro-Oncology*, vol. 15, no. 7, pp. 840–852, 2013.
- [41] A. Canellada, I. Alvarez, L. Berod, and T. Gentile, "Estrogen and progesterone regulate the IL-6 signal transduction pathway in antibody secreting cells," *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 111, no. 3–5, pp. 255–261, 2008.
- [42] A. H. Thorne, C. Zanca, and F. Furnari, "Epidermal growth factor receptor targeting and challenges in glioblastoma," *Neuro-Oncology*, vol. 18, no. 7, pp. 914–918, 2016.



**Hindawi**  
Submit your manuscripts at  
<https://www.hindawi.com>



*13.2. Artículo en revista nacional arbitrada*

**Gutiérrez-Rodríguez A**, Camacho-Arroyo I (2016). Papel del factor de bloqueo inducido por progesterona (PIBF) en embarazo y cáncer. TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas. Vol. 19, No. 2: 109-115.



## PAPEL DEL FACTOR DE BLOQUEO INDUCIDO POR PROGESTERONA (PIBF) EN EMBARAZO Y CÁNCER

Araceli Gutiérrez-Rodríguez e Ignacio Camacho-Arroyo\*

Unidad de Investigación en Reproducción Humana, Instituto Nacional de Perinatología-  
 Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Deleg.  
 Coyoacán, C.P. 04510, Ciudad de México, México. E-mail: \*camachorroyo@gmail.com

### RESUMEN

El factor de bloqueo inducido por progesterona (PIBF) es una proteína inmunomoduladora por medio de la cual la progesterona ejerce varios de sus efectos inmunológicos en diferentes células de alta proliferación, que incluyen desde células embrionarias hasta células tumorales. El PIBF ocasiona un incremento en la síntesis de anticuerpos asimétricos y de citocinas tipo Th2 como las interleucinas (IL) 4, 6 y 10, así como una disminución en la actividad citotóxica de las células NK y en la producción de citocinas tipo Th1, como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) e IL-12. Lo anterior provoca una reducción en la relación Th1/Th2 que es característica del embarazo sano, lo que tiene como consecuencia un aumento en la inmunidad humoral y una disminución en la inmunidad celular. Estos mecanismos inmunomoduladores tienen como resultado una evasión del sistema inmune de la madre por parte del feto para que el embarazo llegue a término. De manera interesante, diversos estudios sugieren que estos mismos mecanismos son utilizados por las células cancerosas para facilitar la progresión de tumores que presentan sobre-expresión del PIBF.

**Palabras Clave:** cáncer, embarazo, linfocitos, PIBF, progesterona.

### Role of progesterone-induced blocking factor (PIBF) in pregnancy and cancer

### ABSTRACT

The progesterone-induced blocking factor (PIBF) is a protein that mediates the immunomodulatory effects of progesterone in cells with high proliferation rate, including embryonic and tumor cells. PIBF increases the synthesis of asymmetric antibodies and Th2 cytokines such as interleukins (IL) 4, 6 and 10, but decreases NK cells cytotoxic activity and Th1 cytokines such as tumor necrosis factor alpha (TNF $\alpha$ ) and IL-12. The former causes a reduction in the rate Th1/Th2 that is distinctive of a healthy pregnancy, which it provokes an increment in humoral immunity as well as a decrease in cellular immunity. These immunomodulatory mechanisms enable the fetus to evade the mother immune system allowing pregnancy proceeds to term. Interestingly, several studies suggest that these same mechanisms are used by cancer cells to facilitate progression of tumors that exhibit overexpression of PIBF.

**Key Words:** cancer, pregnancy, lymphocytes, PIBF, progesterone.

### INTRODUCCIÓN



a progesterona (P<sub>4</sub>) es una hormona esteroide derivada del colesterol, es sintetizada principalmente por los ovarios, placenta y glándulas suprarrenales<sup>[1,2]</sup>. La P<sub>4</sub> es responsable de regular diversas funciones como la

conducta sexual, el embarazo y la neuroprotección<sup>[3-5]</sup>, además de estar involucrada en procesos patológicos como el cáncer<sup>[6,7]</sup>.

Las concentraciones séricas de la P<sub>4</sub> en mujeres con un embarazo sano varían de 100 a 500 nM<sup>[8]</sup> y se ha documentado que bajas concentraciones de P<sub>4</sub> están relacionadas con embarazos con riesgo de aborto o bien, partos prematuros<sup>[8,9]</sup>. Se ha observado que los linfocitos T $\gamma$ / $\delta$  de mujeres con embarazo normal muestran

menor citotoxicidad y una mayor capacidad de unión a la  $P_4$  que aquellos linfocitos de mujeres con embarazo de alto riesgo. Una correlación inversamente proporcional entre la capacidad de unión a la  $P_4$  y la actividad citotóxica de los linfocitos indica que esta hormona genera un efecto de bloqueo de la citotoxicidad de los linfocitos *in vivo* [9]. Este efecto se debe a que la  $P_4$  induce la producción de una proteína denominada factor de bloqueo inducido por progesterona (PIBF), descubierta por primera vez en linfocitos T maternos  $\gamma/\delta$  en 1989 por Szekeres-Bartho *et al.*, [10] y que participa en la regulación de la respuesta inmunológica y el crecimiento tumoral.

### MECANISMOS DE ACCIÓN DE LA PROGESTERONA

Muchas de las acciones de la  $P_4$  se llevan a cabo a partir de la unión con su receptor intracelular a progesterona (RP), que actúa como factor de transcripción regulado por ligando [11,12]. Existen dos principales isoformas de este receptor, RP-A (94 kDa) y RP-B (116 kDa), codificadas por el mismo gen pero con funciones, patrón de expresión y regulación diferentes. La isoforma completa es RP-B mientras que RP-A tiene el extremo N-terminal truncado [11]. La activación de la transcripción de genes blanco involucra la dimerización de estas isoformas, que se unen a los elementos de respuesta a progesterona (PRE) presentes en la región promotora de dichos genes [11-13]. La mifepristona o RU486 es un antagonista del RP que promueve la unión de los dímeros del RP A:A, que al unirse a los PRE resultan ser transcripcionalmente silenciosos; el RU486 también provoca la unión de dímeros del RP A:B lo que resulta en la inhibición de la transcripción de los genes blanco [14].

### LA PROGESTERONA EN EL EMBARAZO

La  $P_4$  es esencial para el establecimiento y el mantenimiento del embarazo y participa en la ovulación, desarrollo uterino [8,13], implantación e inmunomodulación [8]. Niveles bajos de la  $P_4$  en el suero de mujeres embarazadas están relacionados con riesgo de aborto o parto prematuro [9,15], caracterizados por un aumento en la inmunidad relacionada con los linfocitos Th1 y la producción de citocinas por parte de éstos, como son IL-2, IL-12, TNF $\alpha$  e Interferón gamma (IFN $\gamma$ ) [16], mientras que un embarazo sano está caracterizado por un aumento en la inmunidad asociada a linfocitos Th2 y por lo tanto a la producción de citocinas como IL-10, IL-4 e IL-6 [16,17]. La  $P_4$  tiene un papel muy importante al reducir la tasa Th1/Th2 lo que ocasiona un descenso en la actividad citotóxica de los linfocitos maternos [17,18].

Se ha informado que la  $P_4$  disminuye la citotoxicidad de los linfocitos T maternos  $\gamma/\delta$  al igual que la actividad de las células NK [18]. La interacción de la  $P_4$  con el RP presente en los linfocitos T  $\gamma/\delta$  tiene como resultado la secreción del PIBF [19], el cual es responsable de la disminución de la actividad citotóxica de estas células [17,19], este efecto causado por la  $P_4$  es bloqueado con la adición del RU486, lo que indica que la inducción del PIBF se lleva a cabo a través de la activación del RP [19].

### ESTRUCTURA DEL PIBF

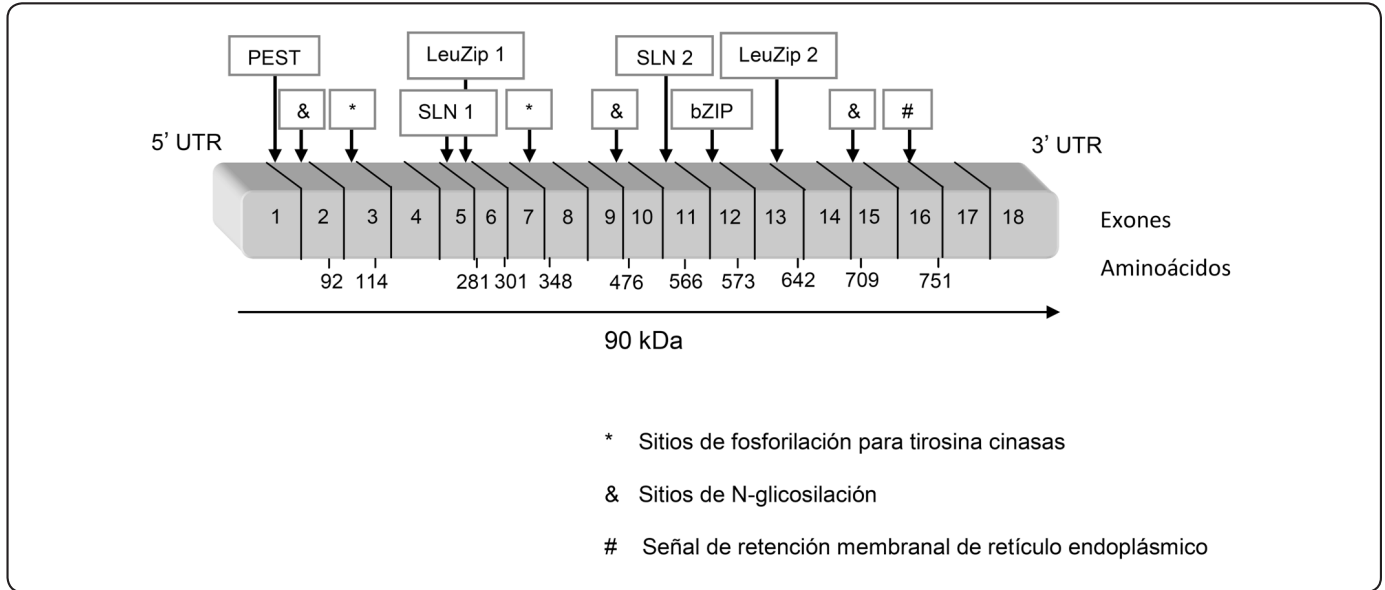
El gen del PIBF se localiza en el cromosoma 13 (13q21-q22), cerca de los genes de susceptibilidad para el cáncer de mama [20]. El mapeo de la secuencia del ADN complementario (cADN) codificante del PIBF y la caracterización de la proteína resultante mediante el uso de una biblioteca de cADN obtenida de células de hígado humano, dio como resultado una clona con un marco de lectura abierto de 2271 pb entre una región de 347 pb y 146 pb de 5' a 3' sin traducir (5' a 3' UTR). En la posición de 348 pb se encuentra el codón de inicio de traducción (ATG) [20].

El análisis del cADN indica que el PIBF contiene 757 aminoácidos con una masa molecular promedio calculada de 89,724 Da y con un punto isoeléctrico teórico de 5.73. El análisis de hidrofobicidad indica que el PIBF es una proteína hidrofílica, con una estructura general de  $\alpha$  hélice [20]. La composición de aminoácidos muestra un alto porcentaje de ácido glutámico (14.4%), leucina (13.6%) y lisina (10.2%), y un menor porcentaje de triptofano (0.1%) y cisteína (0.8%). La molécula contiene un zipper de leucina (LeuZip), una señal de localización nuclear (SLN) y características básicas de zipper de proteínas de unión al ADN (bZIP). Estudios de posibles sitios de modificación posttraduccional revelaron varios sitios de fosforilación para tirosina cinasas y sitios de N-glicosilación [20]. Contiene además de una secuencia putativa PEST, secuencia peptídica con residuos de prolina (P), ácido glutámico (E), serina (S), y treonina (T), que sugiere una vida media corta de la proteína, además de una secuencia de señal corta N-terminal y una señal de retención membranal de retículo endoplásmico (RE) [20] (Figura 1).

A través de la clonación y secuenciación de fragmentos de PCR, en el 2004, Lachmann *et al.*, [21] determinaron la composición de exones de las isoformas resultantes del proceso de corte y empalme alternativo del ARN mensajero (mARN) del PIBF en diferentes tipos celulares, utilizando células mononucleares de sangre periférica de humano (PBMCs), células de la placenta de humano y de ratón, así como también una biblioteca de cADN de testículo de ratón, que se usó para clonar las isoformas resultantes de corte y empalme alternativo. La isoforma de tamaño completo codificada por 18 exones [20, 21], fue la predominante en ratón y en humano, con un peso molecular de 90 kDa y con la amplificación y secuenciación de los fragmentos de PCR se obtuvieron diferentes formas de la proteína de pesos moleculares de 10, 14, 18, 35, 67 y 76 kDa. La mayoría de las estructuras previstas como las SNL, los LeuZip y dominio bZIP no están presentes en estas isoformas de menor tamaño [21].

### LOCALIZACIÓN CELULAR

Un análisis de la secuencia de la proteína de 90 kDa del PIBF, predijo un motivo estructural de hélice superenrollada. Se ha sugerido que las proteínas con esta característica son comunes en el material pericentriolar [22]. Además ciertos miembros de la familia de estas proteínas están implicados en procesos



**Figura 1. Organización de los dominios del PIBF.** El gen del PIBF contiene 18 exones, los cuales codifican para una proteína de 90 kDa, organizada en diversos dominios funcionales. PEST: secuencia peptídica que contiene residuos de prolina (P), ácido glutámico (E), serina (S), y treonina (T); SLN: Señal de localización nuclear; LeuZip: zipper de leucina; bZIP: zipper básico de leucina; \*: sitios de fosforilación para tirosina cinasas; &: sitios de N-glicosilación y #: una señal de retención membranar de retículo endoplásmico (RE).

cancerígenos y se encuentran localizados en el centrosoma, donde regulan la estabilidad de los microtúbulos, afectan la morfología celular, el movimiento, así como el transporte de material intracelular [22].

Estudios de inmunofluorescencia en las líneas celulares HeLa, K562 y OVCAR-3 derivadas de adenocarcinoma de cérvix, leucemia mieloide crónica y adenocarcinoma de ovario respectivamente, sugieren una interacción del PIBF con el aparato de Golgi, el centrosoma y el huso mitótico [21]. Una purificación de los centrosomas de células embrionarias humanas de riñón (HEK293) transfectadas con el plásmido pVpRXXR y una construcción de un vector para lograr la expresión constitutiva del PIBF, sugieren que la proteína de 90 kDa se encuentra presente en forma predominante en el área perinuclear, mientras que una de las isoformas con peso de 35 kDa, se encuentra dispersa en el citoplasma [21]. Kim *et al.*, [22] mostraron por inmunofluorescencia, que al silenciar la expresión del PIBF con ARN de interferencia (siARN) en células HeLa, los centrosomas en las células se observaban íntegros hasta la profase del ciclo celular, sin embargo, ocurría una fragmentación del huso mitótico durante la prometafase y metafase, sugiriendo que el PIBF tiene un papel importante en la integridad del huso mitótico durante la mitosis [22].

### VÍAS DE SEÑALIZACIÓN DEL PIBF

El PIBF se une a un heterodímero compuesto por el receptor del PIBF (PIBF-R) y la cadena  $\alpha$  del receptor de IL-4 (IL-4R) en la

membrana celular [18,23]. Al unirse el PIBF al IL-4R, induce su heterodimerización con el PIBF-R, promoviendo la fosforilación de tirosina en su cadena  $\alpha$  y la activación de la cinasa janus 1 (JAK1), la cual fosforila los residuos de tirosina del receptor para crear sitios de acoplamiento para el transductor de señal y activador de la transcripción 6 (STAT6). Después de unirse a la cadena  $\alpha$  del IL-4R, STAT 6 se convierte en el sustrato de JAK1 [23,24]. La fosforilación de los residuos de tirosina localizados entre el dominio de homología Src 2 (SH2) del IL-4R y el dominio de transactivación C-terminal provoca la dimerización de STAT6 [25]. Finalmente estos dímeros se translocan al núcleo donde se unen a secuencias palindrómicas (secuencia consenso TTCN2-4GAA) en las regiones promotoras de genes blanco para iniciar la transcripción [23] (Figura 2).

Se ha documentado que el PIBF-R se encuentra anclado a glicosilfosfatidilinositol en microdominios localizados en la membrana plasmática, llamados balsas lipídicas, que están enriquecidas con colesterol y glicoesfingolípidos [18]. Mediante microscopía de dos fotones, se ha observado que cuando el PIBF se une con su receptor, disminuye la fluidez de la membrana al formarse agrupaciones de glicoesfingolípidos, colesterol y proteínas de membrana, que ocasionan la integración de una amplia plataforma de balsas lipídicas, que podría desencadenar diferentes respuestas biológicas [18].

La remoción del colesterol de las balsas lipídicas con metil- $\beta$ -ciclodextrina (M $\beta$ -CD) anula el efecto del PIBF en la

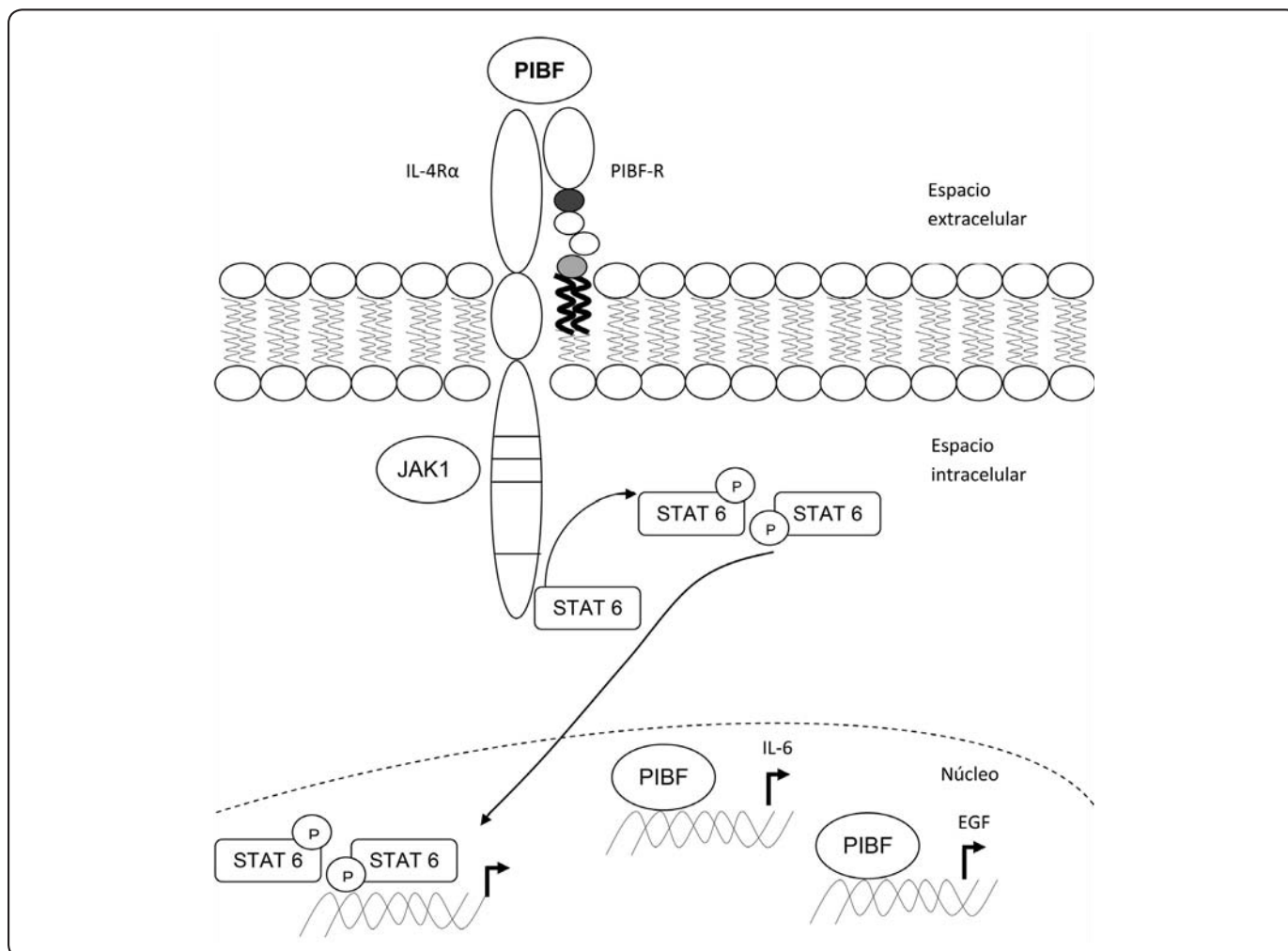


Figura 2. Mecanismo de acción del PIBF. A través de la unión con el complejo IL-4R $\alpha$ /PIBF-R, el PIBF activa la vía JAK1 /STAT6, que está relacionada con la proliferación celular y la producción de citocinas Th2. Además el PIBF es capaz de funcionar como factor de transcripción, mediante su unión a la región promotora de genes como IL-6 y EGF, relacionados con la invasión celular.

activación de la vía JAK1/STAT6<sup>[18]</sup>; este efecto también se logra al bloquear el IL-4R $\alpha$ <sup>[26]</sup> lo que revela la importancia de ambos receptores para la señalización celular mediada por el PIBF.

#### EL PIBF COMO MOLÉCULA INMUNOMODULADORA

Durante un embarazo normal, el PIBF es secretado principalmente por los linfocitos T, la placenta y el útero; su concentración sérica se incrementa continuamente hasta la semana 37 de gestación y hay un marcado descenso al término del embarazo<sup>[27]</sup>. La concentración del PIBF en el suero de mujeres con 24 y 33 semanas de gestación de un embarazo de alto riesgo (59 ng/mL) es significativamente menor que la concentración en el suero de mujeres con embarazo normal (272 ng/mL)<sup>[28,29]</sup> lo que sugiere que el PIBF es una molécula de crucial importancia para el mantenimiento del embarazo.

La capacidad inmunomoduladora del PIBF permite mantener el embarazo en un estado de inmunosupresión<sup>[29,30]</sup>, con el fin de que el feto evada el sistema inmunológico de la madre y el embarazo llegue a término. El PIBF reduce la tasa Th1/Th2<sup>[30]</sup>, lo que contribuye a disminuir la respuesta inmune celular. Se ha demostrado que el PIBF incrementa la producción de citocinas Th2 como IL-10, IL-3 e IL-4 *in vitro*<sup>[30]</sup> e IL-6 *in vivo*<sup>[31]</sup> (Figura 3). La expresión del PIBF en linfocitos T obtenidos del suero de mujeres embarazadas tiene una relación inversa a la concentración de TNF $\alpha$ , y en estudios *in vitro* se observa una inhibición de la expresión de IL-12 por el PIBF<sup>[32]</sup>, obteniendo así una disminución de producción de citocinas tipo Th1<sup>[28,30]</sup> (Figura 3).

El PIBF impide la síntesis de la prostaglandina F2 alfa (PGF2  $\alpha$ ), al inhibir a la fosfolipasa A2 (PLA2), que es la enzima

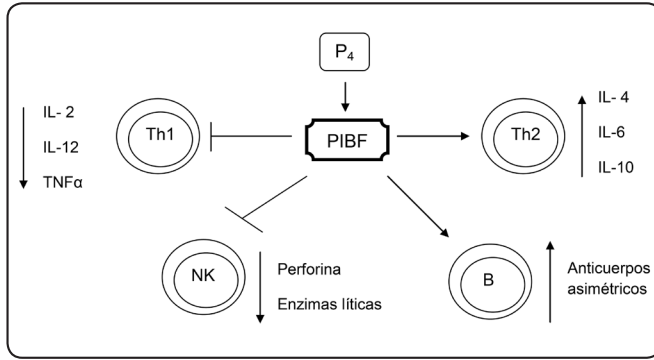


Figura 3. Efectos inmunomoduladores del PIBF. La progesterona (P<sub>4</sub>) induce la expresión del PIBF, el cual, mediante el aumento de citocinas Th2, la disminución de las citocinas Th1, el bloqueo de la actividad de las células NK, así como la regulación de la producción de anticuerpos asimétricos no efectoras por parte de las células B, disminuye la citotoxicidad celular y mantiene un estado de inmunosupresión controlado.

que cataliza la liberación del ácido araquidónico (AA) de los fosfolípidos de membrana y que es posteriormente convertido a prostaglandinas por la enzima ciclooxigenasa 2 (COX-2)<sup>[31]</sup>. Al inhibirse la PGF2  $\alpha$  se reduce la producción de IL-12 y la actividad citotóxica de las células NK<sup>[31]</sup>.

Con el incremento de citocinas tipo Th2, el PIBF provoca la síntesis de anticuerpos asimétricos por los linfocitos B, debido a su estructura asimétrica, estos anticuerpos no tienen funciones efectoras, sino que funcionan como anticuerpos de bloqueo<sup>[33]</sup> (Figura 3). El PIBF bloquea la lisis mediada por células NK en fibroblastos embrionarios humanos *in vitro*<sup>[34]</sup> y en células del bazo de ratonas Balb/c embarazadas que fueron tratadas con progesterona<sup>[35]</sup>. Este efecto del PIBF se asoció a la inhibición de la liberación de perforina de las células NK, así como también por la disminución de la degranulación y secreción de las enzimas líticas por parte de estas células<sup>[36]</sup> (Figura 3).

## PIBF Y CÁNCER

Se ha relacionado al PIBF con la progresión tumoral debido a su proximidad a los genes de susceptibilidad para el cáncer de mama en el cromosoma 13<sup>[20]</sup> y a su localización celular en el centrosoma<sup>[21]</sup>. El PIBF puede ser secretado por células cancerígenas para evadir el sistema inmune y así contribuir al desarrollo tumoral<sup>[16,27]</sup>. Se ha reportado que el PIBF se encuentra sobre-expresado en tejido tumoral de útero, mama y estómago en comparación con el tejido sano respectivo<sup>[28]</sup>. La concentración sérica del PIBF en pacientes que presentan tumores malignos llega a ser hasta de 1000 ng/mL, significativamente más alta que la concentración de 272 ng/mL que se observa durante el inicio del tercer trimestre de un embarazo normal<sup>[27,29]</sup>.

Lachmann *et al.*,<sup>[21]</sup> demostraron por estudios *in vitro* que el PIBF se encuentra altamente expresado en diversas líneas

celulares tumorales de humano, como HeLa, K562, OVCAR-3, T47D, SK-BR3 y MCF-7, derivadas de un adenocarcinoma de cérvix, una leucemia mieloide crónica, un adenocarcinoma de ovario, un carcinoma ductal de mama y las dos últimas de adenocarcinomas de mama, respectivamente<sup>[21]</sup>. Srivastava *et al.*,<sup>[24]</sup> encontraron que el PIBF se expresa en diversas líneas celulares de forma constitutiva, como U937, SRIK-B (T-PLL) y SRIK-NKL, derivadas de un linfoma histiocítico mieloide, una leucemia de células B y una leucemia de células NK respectivamente y que además, el PIBF se induce por efecto de la P<sub>4</sub> y la adición del RU486 bloqueaba la inducción (Tabla I).

En la línea celular U373, derivada de un astrocitoma humano grado III, la P<sub>4</sub> induce la expresión del PIBF a nivel del mRNA y de la proteína<sup>[37]</sup>. En este mismo estudio se encontró que la isoforma completa de 90 kDa se encuentra principalmente en el núcleo, mientras que la isoforma detectada de 57 kDa se localiza primordialmente en el citoplasma<sup>[37]</sup>, lo que concuerda con los resultados de Lachmann, en el 2004<sup>[21]</sup>. Mediante una co-inmunoprecipitación se pudo demostrar la asociación del PIBF con el IL-4R, y se corroboró el aumento de la fosforilación de JAK1 y de STAT6 que indica la activación de esta vía<sup>[37]</sup>. Las líneas derivadas de astrocitomas humanos grado III y IV sobre-expresan STAT6 en comparación con astrocitos normales, por lo que se ha relacionado a esta vía con el crecimiento e invasión celulares<sup>[38]</sup>. De manera interesante, se observó que el PIBF aumenta la proliferación de las células U373.

Con el uso de un ensayo de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) en células HT-1080 derivadas de un fibrosarcoma humano, se descubrió que el PIBF tiene la capacidad de unirse a la región promotora de genes como IL-6 y el factor de crecimiento epidérmico (EGF) (Figura 2)<sup>[39]</sup>. En ensayos *in vivo* mediante un xenotrasplante de células HT-1080 con siARN contra el PIBF inyectadas en el saco vitelino del embrión del pez cebra, se observó que las células mostraban un menor potencial invasivo en comparación con el grupo control, lo cual sugiere que el PIBF facilita la invasión tumoral. El silenciamiento del PIBF resulta en la disminución de las metaloproteinasas de la matriz extracelular 2 y 9 (MMP-2 y MMP-9) en las células HT-1080. Además el tratamiento con el PIBF aumenta la expresión de IL-6 y ésta a su vez induce la fosforilación en los residuos de serina 727 y tirosina 705 de STAT3, activando la vía JAK1/STAT3, la cual se ha relacionado con la invasión celular<sup>[39]</sup>.

Posteriores investigaciones sobre las vías de señalización del PIBF y sus mecanismos de acción permitirán dilucidar el papel que tiene este factor en el embarazo, así como en la iniciación y progresión tumoral, y de esta manera evaluar si puede ser considerado como un posible blanco terapéutico.

## CONCLUSIONES

El PIBF es una proteína que se encuentra altamente expresada en diversas células que poseen una elevada capacidad de

Línea celular	Origen	Inducción por Progesterona	Bloqueo de la inducción por el RU486	Referencia
HeLa	Adenocarcinoma de cérvix	NI	NI	Lachmann <i>et al.</i> , 2004 <sup>[21]</sup>
OVCAR-3	Adenocarcinoma de ovario	NI	NI	Lachmann <i>et al.</i> , 2004 <sup>[21]</sup>
SK-BR3	Adenocarcinoma de mama	NI	NI	Lachmann <i>et al.</i> , 2004 <sup>[21]</sup>
K562	Leucemia Mieloide Crónica	NI	NI	Lachmann <i>et al.</i> , 2004 <sup>[21]</sup>
T47D	Carcinoma ductal de mama	NI	NI	Lachmann <i>et al.</i> , 2004 <sup>[21]</sup>
HT-1080	Fibrosarcoma humano	NI	NI	Halasz <i>et al.</i> , 2013 <sup>[39]</sup>
SRIK-NKL	Leucemia de células NK	Si	Si	Srivastava <i>et al.</i> , 2007 <sup>[24]</sup>
SRIK-B (T-PLL)	Leucemia de células B	Si	Si	Srivastava <i>et al.</i> , 2007 <sup>[24]</sup>
U937	Linfoma histiocítico mieloide	Si	Si	Srivastava <i>et al.</i> , 2007 <sup>[24]</sup>
U373	Astrocitoma humano grado III	Si	Si	González <i>et al.</i> , 2014 <sup>[37]</sup>

Tabla I. Expresión del PIBF en diferentes líneas celulares tumorales y su regulación por la P<sub>4</sub>. NI = No ha sido investigado.

proliferación, y están involucradas tanto en procesos fisiológicos como el desarrollo embrionario, y en patológicos como el cáncer. El PIBF mediante el proceso de corte y empalme alternativos exhibe varias isoformas, la más abundante en diversos tipos celulares es la de 90 kDa, asociada al centrosoma que actúa como factor transcripcional de diversos genes involucrados en procesos de proliferación y migración celulares, como IL-6 y EGF; las demás isoformas son más pequeñas y se sugiere que actúan de forma autocrina funcionando como ligando al unirse al heterocomplejo PIBF-R/IL-4R $\alpha$ , activando diversas vías de señalización, siendo la más estudiada la vía JAK1/STAT6, que está involucrada tanto en procesos de proliferación celular como en un aumento de producción de citocinas Th2. En diversos tumores se ha encontrado una alteración en la tasa Th1/Th2, con predominio de las citocinas de linfocitos Th2, fenómeno que pudiera ser atribuido en parte a la capacidad inmunomoduladora del PIBF ampliamente documentada durante el embarazo.

#### AGRADECIMIENTOS

Araceli Gutiérrez Rodríguez es becaria CONACyT del Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas, UNAM.

#### REFERENCIAS

1. Brunton, P.J. & Russell, J. The expectant brain: adapting for motherhood. *Nat. Rev. Neurosci.* **9**, 11–25 (2008).

- Melcangi, R.C., *et al.* Levels and actions of progesterone and its metabolites in the nervous system during physiological and pathological conditions. *Prog. Neurobiol.* **113**, 56–69 (2014).
- Graham, J.D. & Clarke, C.L. Physiological action of progesterone in target tissues. *Endocr. Rev.* **18**, 502–519 (1997).
- Brinton, R.D., *et al.* Progesterone receptors: form and function in brain. *Front. Neuroendocrinol.* **29**, 313–39 (2009).
- Schumacher, M., *et al.* Local synthesis and dual actions of progesterone in the nervous system: neuroprotection and myelination. *Growth Horm IGF Res.* **14 Suppl A**, S18–S33 (2009).
- Cabrera-Muñoz, E. Hernández, O.T. & Camacho-Arroyo, I. Role of progesterone in human astrocytomas growth. *Curr. Top Med. Chem.* **11**, 1663–1667 (2011).
- Finlay, J., *et al.* Progesterone downregulation of miR-141 contributes to expansion of stem-like breast cancer cells through maintenance of progesterone receptor and Stat5a. *Oncogene.* **34**, 3676–3687 (2015).
- Szekeres-Bartho, J., *et al.* Progesterone as an immunomodulatory molecule. *Int Immunopharmacol.* **1**, 1037–1048 (2001).
- Szekeres-Bartho, J. Csernus, V. Hadnagy, J. & Pacsa, A.S. Immunosuppressive effect of serum progesterone during pregnancy depends on the progesterone binding capacity of the lymphocytes. *J. Reprod. Immunol.* **5**, 81–88 (1983).
- Szekeres-Bartho, J., *et al.* Immunoregulatory effects of a suppressor factor from healthy pregnant women's lymphocytes after progesterone induction. *Cell Immunol.* **122**, 281–94 (1989).

11. Camacho-Arroyo, I. & Rodríguez-Dorantes, M. Transcriptional activity regulated by progesterone receptor isoforms. *Mol. Endocrinol.* **661**, 25-38 (2006).
12. Schumacher, M. *et al.* Revisiting the roles of progesterone and allopregnanolone in the nervous system: Resurgence of the progesterone receptors. *Prog. Neurobiol.* **113**, 6-39 (2014).
13. Conneely, O.M. & Lydon J.P. Progesterone receptors in reproduction: functional impact of the A and B isoforms. *Steroids.* **65**, 571-577 (2000).
14. Chen, J. The unique pharmacological characteristics of mifepristone (RU486): from terminating pregnancy to preventing cancer metastasis. *Med. Res. Rev.* **34**, 979-1000 (2014).
15. Szekeres-Bartho, J. & Chauat, G. Lymphocyte-derived progesterone-induced blocking factor corrects resorption in a murine abortion system. *Am. J. Reprod. Immunol.* **23**, 26-28 (1990).
16. Szeredapy, L. Argaa, V. & Szekeres-Bartho, J. Cytokine Production by Lymphocytes in Pregnancy, *Am. J. Reprod. Immunol.* **38**, 418-411 (1997).
17. Szekeres-Bartho, J., *et al.* Endocrine regulation of the immune system during pregnancy. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz).* **38**, 125-140 (1990).
18. De la Haba, Carlos., *et al.* Oxidative stress effect on progesterone-induced blocking factor (PIBF) binding to PIBF-receptor in lymphocytes. *Biochim. Biophys. Acta.* **1838**, 148-157 (2014).
19. Szekeres-Bartho, J., *et al.* Immunoregulatory effects of a suppressor factor from healthy pregnant women's lymphocytes after progesterone induction. *Cell Immunol.* **122**, 281-94 (1989).
20. Polgar, B., *et al.* Molecular cloning and immunologic characterization of a novel cDNA coding for progesterone-induced blocking factor. *J. Immunol.* **171**, 5956-5963 (2003).
21. Lachmann, M., *et al.* PIBF (progesterone induced blocking factor) is overexpressed in highly proliferating cells and associated with the centrosome. *Int. J. Cancer.* **112**, 51-60 (2004).
22. Kim, K. & Rhee, K. The pericentriolar satellite protein CEP90 is crucial for integrity of the mitotic spindle pole. *J. Cell Sci.* **124**, 338-347 (2011).
23. Kozma, N., *et al.* Progesterone-induced blocking factor activates STAT6 via binding to a novel IL-4 receptor. *J. Immunol.* **176**, 819-826 (2006).
24. Srivastava, M.D, Thomas, A. Srivastava, B.I. & Check J.H. Expression and modulation of progesterone induced blocking factor (PIBF) and innate immune factors in human leukemia cell lines by progesterone and mifepristone. *Leuk Lymphoma.* **48**, 1610-1617 (2007).
25. Keats, N., *et al.* The IL-4 receptor: signaling mechanisms and biologic functions. *Annu. Rev. Immunol.* **17**, 701-738 (1999).
26. Darnell, J.E. Kerr, I.M. & Stark, G.R. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science.* **264**, 1415-1421 (1994).
27. Szekeres-Bartho, J. & Polgar, B. PIBF: the double edged sword. Pregnancy and tumor. *Am. J. Reprod. Immunol.* **64**, 77-86 (2010).
28. Hudić, I., *et al.* Progesterone-Induced Blocking Factor and cytokine profile in women with threatened pre-term delivery. *Am. J. Reprod. Immunol.* **61**, 330-337 (2009).
29. Szekeres-Bartho, J. Varga, P.P. & Pejtsik, B. ELISA test for the detection of an immunological blocking factor in human pregnancy serum. *J. Reprod. Immunol.* **16**, 19-29 (1989).
30. Szekeres-Bartho, J. Wegmann, T.G. A progesterone-dependent immunomodulatory protein alters the Th1/Th2 balance. *J. Reprod. Immunol.* **31**, 81-95 (1996).
31. Luchetti, C.G. Mikó, E. Szekeres-Bartho, J. Paz, D.A. & Motta, A.B. Dehydroepiandrosterone and metformin modulate progesterone-induced blocking factor (PIBF), cyclooxygenase 2 (COX2) and cytokines in early pregnant mice. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* **111**, 200-207 (2008).
32. Szekeres-Bartho, J., *et al.* The immunological pregnancy protective effect of progesterone is manifested via controlling cytokine production. *Am. J. Reprod. Immunol.* **35**, 348-351 (1996).
33. Kelemen, K. Bogнар, I. Paal, M. & Szekeres-Bartho, J. A Progesterone-Induced Protein Increases the Synthesis of Asymmetric Antibodies. *Cell Immunol.* **167**, 129-134 (1996).
34. Szekeres-Bartho, J., *et al.* Increased NK activity is responsible for higher cytotoxicity to HEF cells by lymphocytes of women with threatened preterm delivery. *Am. J. Reprod. Immunol. Microbiol.* **7**, 22-26 (1985).
35. Szekeres-Bartho, J. Kinsky, R. & Chauat G. The effect of a progesterone induced immunologic blocking factor on NK-mediated resorption. *Am. J. Reprod. Immunol.* **24**, 105-107 (1990).
36. Faust, Z. Laskarin, G. Rukavina, D. & Szekeres-Bartho, J. Progesterone-induced blocking factor inhibits degranulation of natural killer cells. *Am. J. Reprod. Immunol.* **42**, 71-75 (1999).
37. González-Arenas, A. Valadez-Cosmes, P. Jiménez-Arellano, C. López-Sánchez, M. & Camacho-Arroyo, I. Progesterone-induced blocking factor is hormonally regulated in human astrocytoma cells, and increases their growth through the IL-4R/JAK1/STAT6 pathway. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* **144**, 463-470 (2014).
38. Merk, B.C, *et al.* STAT6 expression in glioblastoma promotes invasive growth. *BMC Cancer.* **20**, 11:184 (2011).
39. Halasz, M. Polgar, B. Berta, G. Czimbalek, L. & Szekeres-Bartho, J. Progesterone-induced blocking factor differentially regulates trophoblast and tumor invasion by altering matrix metalloproteinase activity. *Cell Mol. Life Sci.* **70**, 4617-4630 (2013).

*13.3. Artículo en revista de divulgación*

**Gutiérrez-Rodríguez A, Zamora-Sánchez C, Camacho-Arroyo I (2016).** Las hormonas sexuales en el desarrollo de tumores cerebrales. AAPAUNAM, Año 8 No.1: 28-32.



# Las hormonas sexuales en el desarrollo de tumores cerebrales

*Dra. Araceli Gutiérrez-Rodríguez\**  
*Dra. Carmen Janín Zamora-Sánchez\**  
*Dr. Ignacio Camacho-Arroyo\**

Los tumores del sistema nervioso central (SNC) surgen de células que presentan anomalías en los procesos de proliferación, diferenciación y muerte celulares<sup>1</sup>. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), estos tumores se clasifican, con base en sus características histológicas, celulares y moleculares, en tumores de los nervios craneales y espinales, de las meninges, tumores de células germinales y del tejido neuroepitelial, entre otros. Los tumores del tejido neuroepitelial más comunes son los gliomas, que se clasifican de acuerdo con el tipo de célula glial con la que guardan mayor relación; ejemplo de éstos, son los astrocitomas, cuyas características histológicas corresponden a los astrocitos, un tipo de células gliales con múltiples funciones en el SNC<sup>2</sup>.

Los astrocitomas son los tumores más frecuentes del SNC adulto, constituyen 70% de todos los casos de gliomas<sup>1</sup> y se ha observado que su frecuencia es mayor en hombres que en mujeres en una relación de 3:23. La detección de estos tumo-

res a menudo ocurre en un grado avanzado de la enfermedad, debido a que la sintomatología (dolor de cabeza, náuseas, cambio en el estado de ánimo, convulsiones, entre otros) suele ser atribuida a otras patologías, o bien porque el paciente no asiste a un servicio neurológico<sup>4</sup>.

Los astrocitomas se clasifican —de acuerdo con sus características histológicas (morfología, cantidad de células que se encuentran en división y número de núcleos que presentan) y su capacidad de invadir el tejido circundante— en cuatro grados de malignidad (I-IV)<sup>5</sup>. El grado I es el menos agresivo; estos tumores están bien delimitados y presentan baja proliferación. Los astrocitomas de grado II y III presentan mayor infiltración, son invasivos y tienden a proliferar rápidamente; generalmente evolucionan a grados más avanzados. Los astrocitomas de grado IV o glioblastoma multiforme, constituyen el tipo de astrocitoma más agresivo, con alta proliferación, vascularización y resistencia a la quimio y radiote-

\*Unidad de Investigación en Reproducción Humana, Instituto Nacional de Perinatología-Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.  
 Correspondencia  
 Dr. Ignacio Camacho-Arroyo,  
 Unidad de Investigación en Reproducción Humana,  
 Instituto Nacional de Perinatología-Facultad de Química,  
 Universidad Nacional Autónoma de México,  
 Ciudad Universitaria, Coyoacán 04510,  
 Ciudad de México, México.

rapia, por lo que los pacientes con estos tumores tienen una supervivencia menor a 12 meses<sup>3</sup>. El tratamiento para los astrocitomas grado I es la resección quirúrgica total seguida de quimio o radioterapia, aumentando considerablemente la supervivencia de los pacientes. Para los grados II-IV el tratamiento suele ser la resección quirúrgica parcial seguida de radio o quimioterapia; sin embargo, éste ha demostrado ser poco eficaz, ya que la recurrencia de estos tumores es muy elevada y sólo 10% de los pacientes alcanza una supervivencia mayor a dos años tras la terapia<sup>1</sup>.

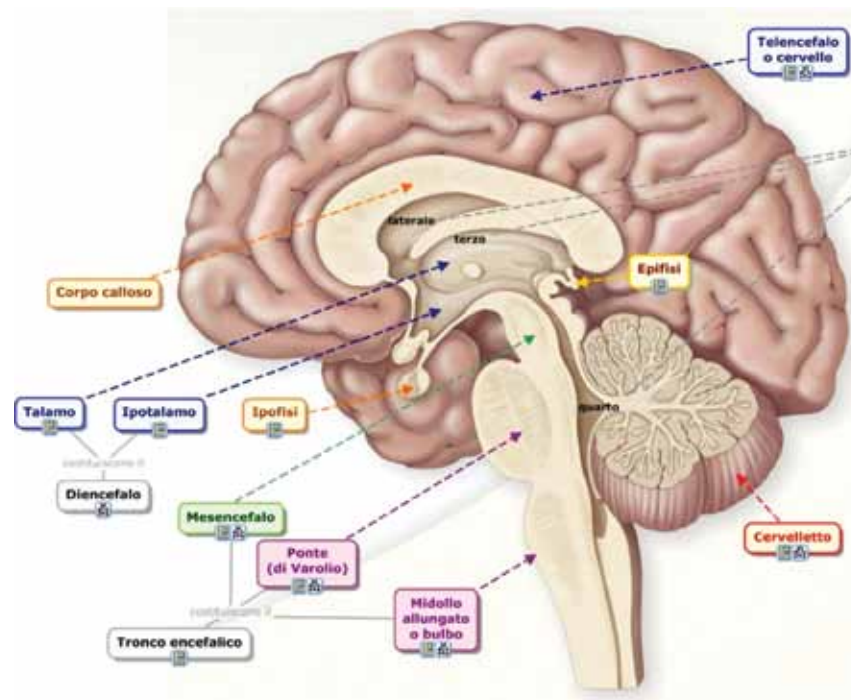
En diversos grupos de investigación, incluido el nuestro, se ha observado que la estimulación endócrina llevada a cabo por acción de las hormonas sexuales, es crucial para el desarrollo y la progresión tumoral de los astrocitomas, especialmente de grados III y IV<sup>6</sup>. De ahí que actualmente se busquen nuevas estrategias terapéuticas menos agresivas para el paciente que puedan mejorar su calidad y esperanza de vida, basadas en el conocimiento de los mecanismos que tienen las hormonas sexuales para contribuir al rápido desarrollo y progresión de los tumores cerebrales.

Las hormonas sexuales son compuestos esteroideos derivados del colesterol que se sintetizan principalmente en las gónadas, las glándulas adrenales y en el SNC<sup>7</sup>. Las más importantes son los progestágenos, andrógenos y estrógenos; los miembros más activos de dichos grupos son la progesterona ( $P_4$ ), testosterona (T) y el

estradiol ( $E_2$ ), respectivamente<sup>8</sup>. A escala fisiológica estas hormonas regulan procesos como la reproducción, respuesta inmunológica, neuroprotección, el aprendizaje y la memoria. Debido a que actúan en todo el organismo, también están implicadas en procesos patológicos, como el cáncer, siendo los más estudiados el cáncer de mama y el de próstata<sup>9</sup>.

Las hormonas sexuales llevan a cabo sus funciones a partir de dos mecanismos: el genómico (o clásico) y el no genómico (o no clásico). A nivel del SNC, muchas de las acciones de la  $P_4$  y el  $E_2$  ocurren a través de su mecanismo genómico; éste requiere la interacción de las hormonas con sus proteínas receptoras: el RP para la  $P_4$  y el RE para el  $E_2$ . El RP presenta dos proteínas principales: el RP-B y RP-A. De manera similar al RP, las

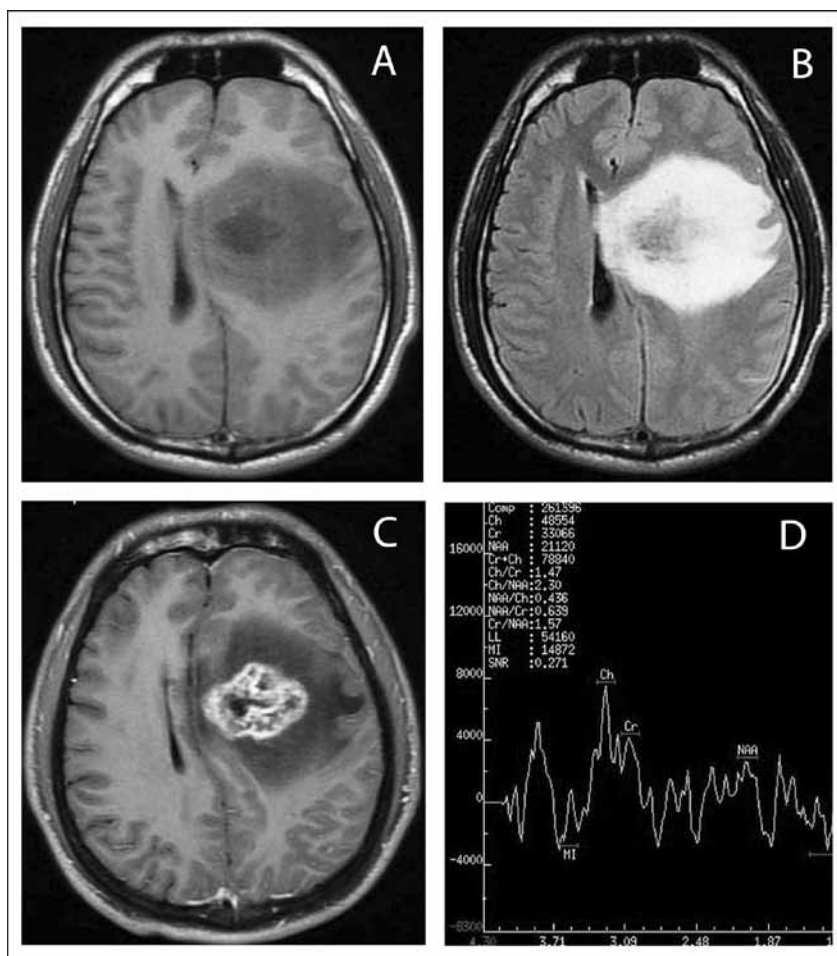
*De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, estos tumores se clasifican, con base en sus características histológicas, celulares y moleculares, en tumores de los nervios craneales y espinales, de las meninges, tumores de células germinales y del tejido neuroepitelial, entre otros*



Anatomía del cerebro.

Fuente: <http://biologiyactma.com/blogs/1byg/unidades/sistema-nervioso/>

*Las hormonas sexuales son compuestos esteroideos derivados del colesterol que se sintetizan principalmente en las gónadas, las glándulas adrenales y en el SNC. Las más importantes son los progestágenos, andrógenos y estrógenos; los miembros más activos de dichos grupos son la progesterona ( $P_4$ ), testosterona ( $T$ ) y el estradiol ( $E_2$ ), respectivamente. A escala fisiológica estas hormonas regulan procesos como la reproducción, respuesta inmunológica, neuroprotección, el aprendizaje y la memoria*



Astrocitoma anaplásico.

Fuente: [http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1516-31802014005032407&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1516-31802014005032407&script=sci_arttext)

dos proteínas principales del RE son el RE- $\alpha$  y el RE- $\beta$ <sup>10,11</sup>.

En el mecanismo genómico, una vez que la hormona ingresa a la célula por difusión a través de la membrana, se une a su receptor, este complejo receptor-hormona se une al ADN y regula la expresión de genes; en el mecanismo no genómico estas hormonas interactúan con receptores que se encuentran en la membrana y provocan cambios en los niveles de iones y mensajeros químicos intracelulares<sup>7</sup>.

El  $E_2$  induce el crecimiento de astrocitomas a través del RE- $\alpha$  y de su regulación de la expresión de genes involucrados en el control del ciclo celular, la an-

giogénesis (generación de vasos sanguíneos) y la metástasis (propagación del tumor a diferentes órganos y tejidos). En estudios se ha observado que la expresión de RE disminuye en células derivadas de astrocitomas de mayor grado de malignidad, esto concuerda con los resultados de biopsias de astrocitomas donde la expresión del RE se reduce durante el desarrollo del tumor. Lo anterior podría estar relacionado con una regulación diferencial de genes dependientes de estrógenos a medida que aumenta el grado del tumor<sup>12</sup>.

La expresión del RP ha sido también determinada en biopsias de astrocitomas humanos y está

directamente relacionada con la progresión del tumor, sugiriendo que los tumores positivos a RP presentan un potencial altamente proliferativo<sup>13</sup>. En estudios *in vitro* en nuestro laboratorio se reportó que en células D54 y células U373 derivadas de un glioblastoma multiforme humano y de un astrocitoma humano grado III, respectivamente la  $P_4$ , a través del RP, aumenta el número de células debido a alteraciones en mecanismos de proliferación celular, mediante cambios en la expresión genes, tales como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) que promueve la angiogénesis, el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) que promueve la división celular y la ciclina D1, que es una proteína involucrada en la regulación del ciclo celular<sup>14</sup>.

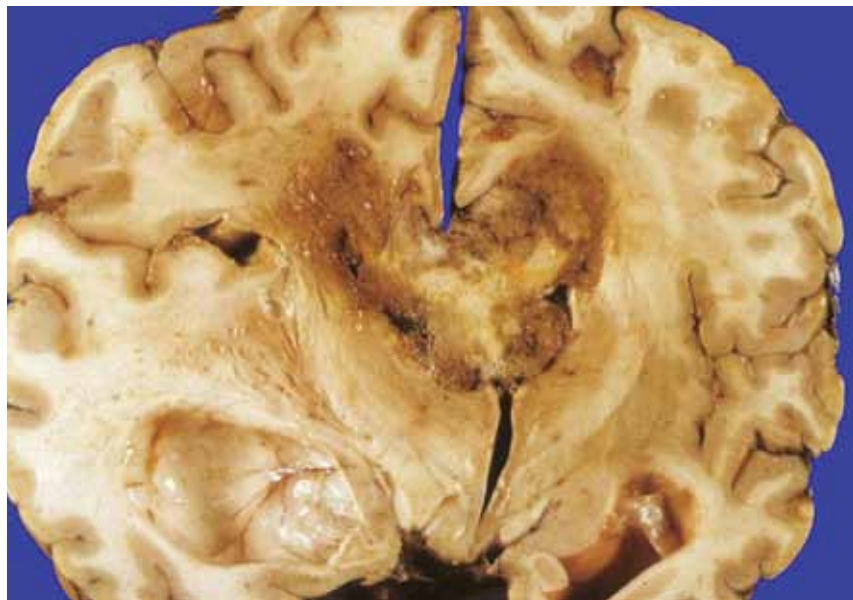
Recientemente se observó que la  $P_4$  promueve la migración e invasión de células D54; sin embargo, los mecanismos por los que se efectúan estos procesos no han sido totalmente caracterizados. En modelos *in vivo*, reportamos que la  $P_4$ , mediante su interacción con el RP, aumenta la proliferación e infiltración de un tumor causado por la implantación de células derivadas de un astrocitoma humano en la corteza cerebral de la rata<sup>15</sup>. Mediante análisis de microarreglos, una herramienta que permite el análisis masivo de genes contenidos en una muestra, pudo determinarse que la  $P_4$  induce la expresión de por lo menos 30 genes diferentes en la línea celular U373, entre ellos, genes que promueven la metástasis, como

el GLIPR2 y AOC3, así como otros que han sido asociados a un aumento en la agresividad del tumor en cáncer de mama, de riñón, de próstata y de pulmón<sup>16</sup>.

En todos los estudios anteriores, los efectos de la  $P_4$  en el aumento de número de células, proliferación celular, migración e infiltración, se vieron bloqueados por el antagonista del RP: la mifepristona (RU486)<sup>15</sup>. Este último es un compuesto que actúa como un antagonista del RP, es decir, tiene efectos contrarios a la  $P_4$ . Lo anterior causa una inhibición en la expresión de genes en células sensibles a  $P_4$ , lo que deriva en el bloqueo de los efectos de la  $P_4$ , es por esta razón que se ha propuesto como un posible método terapéutico en diversos tipos de cáncer<sup>17</sup>.

En un estudio reciente se demuestran los beneficios paliativos del tratamiento oral con RU486. En un paciente con diagnóstico de

*En un estudio reciente se demuestran los beneficios paliativos del tratamiento oral con RU486. En un paciente con diagnóstico de glioblastoma multiforme, el RU486 aumentó su esperanza de vida más allá del tiempo pronosticado sin el tratamiento*



Corte histopatológico de tumor.

Fuente: <http://medicablogs.diariomedico.com/jmsanz/2010/08/08/tumor-solido-cerebral-por-exposicion-ocupacional-a-formaldehido/>

glioblastoma multiforme, el RU486 aumentó su esperanza de vida más allá del tiempo pronosticado sin el tratamiento<sup>18</sup>.

Hoy se idean estrategias terapéuticas para el tratamiento de los astrocitomas teniendo como objetivo la inhibición de los efectos de la P<sub>4</sub> sobre este tipo de tumores. Con el conocimiento que se tiene sobre los mecanismos de las hormonas sexuales, en particular la P<sub>4</sub>, se están realizando nuevas investigaciones que permitirán tener mayor comprensión sobre la influencia de las hormonas sexuales en los procesos involucrados en el desarrollo y progresión de los gliomas y que posibiliten el diseño de un mejor tratamiento para los pacientes con esta patología.

*Se están realizando nuevas investigaciones que permitirán tener una mayor comprensión sobre la influencia de las hormonas sexuales en los procesos involucrados en el desarrollo y progresión de los gliomas y que posibiliten el diseño de un mejor tratamiento para los pacientes con esta patología*

## REFERENCIAS

- Hanahan, D., Weinberg, R. A. (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation". *Cell*, 144(5), 646-674.
- Louis, D. N., Ohgaki, H., Wiestler, O. D., et al. (2007). "The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system". *Acta Neuropathologica*, 114(2), 97-109.
- Schwartzbaum, J. A., Fisher, J. L., Aldape, K. D., Wrensch, M. (2006). "Epidemiology and molecular pathology of glioma". *Nature Clinical Practice. Neurology*, 2(9), 494-503.
- Buckner, J. C., Brown, P. D., O'Neill, B. P., Meyer, F. B., Wetmore, C. J., Uhm, J. H. (2007). "Central nervous system tumors". *Mayo Clinic Proceedings*, 82(10), 1271-1286.
- Kim, T. S., Halliday, A. L., Hedley-Whyte, E. T., Convery, K. (1991). "Correlates of survival and the Daumas-Duport grading system for astrocytomas". *Journal of Neurosurgery*, 74(1), 27-37.
- Cabrera-Muñoz, E., Hernández-Hernández, O. T., Camacho-Arroyo, I. (2011). "Role of progesterone in human astrocytomas growth". *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 11(13), 1663-1667.
- Melcangi, R.C., Garcia-Segura, L.M., Mensah-Nyagan, A.G., (2008). "Neuroactive steroids: state of the art and new perspectives". *Cellular and Molecular Life Sciences* 65, 777-797.
- Henley, D., Lindzey, J., Korach, K. (2005). "Steroid Hormones". In: Melmed S, Conn P (eds). *Endocrinology. Basic and Clinical Principles*, 2 edn. New Jersey: Humana Press: 49-65.
- Hernández-Hernández, O. T., Rodríguez-Dorantes, M., González-Arenas, A., Camacho-Arroyo, I. (2010). "Progesterone and estradiol effects on SRC-1 and SRC-3 expression in human astrocytoma cell lines". *Endocrine*, 37(1), 194-200.
- Carroll, R. S., Zhang, J., Dashner, K., Sar, M., Black, P. M. (1995). "Steroid hormone receptors in astrocytic neoplasms". *Neurosurgery*. 37(3), 496-503.
- Camacho-Arroyo, I., González-Aguero, G., Gamboa-Domínguez, A., Cerbón, M. A., Ondarza, R. (2000). "Progesterone receptor isoforms expression pattern in human chordomas". *Journal of Neuro-Oncology*, 49(1), 1-7.
- González-Arenas, A., Hansberg-Pastor, V., Hernández-Hernández, O. T., González-García, T. K., Henderson-Villalpando, J., Lemus-Hernández, D., Cruz-Barrios, A., Rivas-Suárez, M., Camacho-Arroyo, I. (2012). "Estradiol increases cell growth in human astrocytoma cell lines through ER $\alpha$  activation and its interaction with SRC-1 and SRC-3 coactivators". *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1823, 379-386.
- Cabrera-Muñoz, E. González-Arenas, A., Saqui-Salces, M., Camacho, J., Larrea, F., García-Becerra, R., Camacho-Arroyo, I. (2009). "Regulation of progesterone receptor isoforms content in human astrocytoma cell lines". *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 113, 80-84.
- Hernández-Hernández, O. T., González-García, T. K., Camacho-Arroyo, I. (2012). "Progesterone receptor and SRC-1 participate in the regulation of VEGF, EGFR and Cyclin D1 expression in human astrocytoma cell lines". *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 132, 127-134.
- Germán-Castelán, L., Manjarrez-Marmolejo, J., González-Arenas, A., González-Morán, M. G., & Camacho-Arroyo, I. (2014). "Progesterone induces the growth and infiltration of human astrocytoma cells implanted in the cerebral cortex of the rat". *BioMed Research International*, 393174.
- González-Arenas, A., Cabrera-Wrooman, A., Díaz, N. F., González-García, K., Salido-Guadarrama, I., Rodríguez-Dorantes, M., Camacho-Arroyo, I. (2014). "Progesterone Receptor subcellular localization and gene expression profile in human astrocytoma cells are modified by progesterone". *Nuclear Receptor Research*, 1, 1-10.
- Chen, J., Wang, J., Shao, J., et al. (2014). "The unique pharmacological characteristics of mifepristone (RU486): from terminating pregnancy to preventing cancer metastasis". *Med Res Rev.* 34, 979-1000.
- Check, J., Wilson, C., Cohen, R., Sarumi, M. (2014). "Evidence that mifepristone, a progesterone receptor antagonist, can cross the blood brain barrier and provide palliative benefits for glioblastoma multiforme grade IV". *Anticancer Research* 34 (5), 2385-2388.